

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GEBELİKTE OLAYLANAN DENEYSEL HİPOKSİDE GİNKGO BİLOBA’NIN
TESTİS DOKUSUNDA OLASI ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif ENSARİ

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Gülnur TAKE

ANKARA
Ocak 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GEBELİKTE OLAYLANAN DENEYSEL HİPOKSİDE GİNKGO BİLOBA’NIN
TESTİS DOKUSUNDA OLASI ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif ENSARİ

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Gülnur TAKE

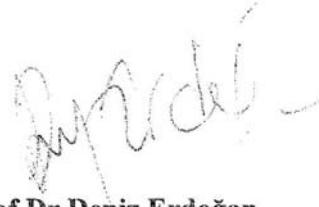
Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri birimi tarafından 01/2008-04 kod numaralı proje ile desteklenmiştir.

ANKARA
Ocak 2010

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

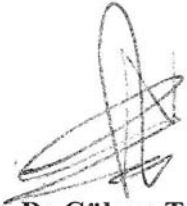
Tez Savunma Tarihi : 21 /01/2010



**Prof.Dr.Deniz Erdoğan
Gazi Üniversitesi**



**Prof.Dr.Rabet Gözil
Gazi Üniversitesi**



**Doç.Dr.Gölnur Take
Gazi Üniversitesi**

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Şekiller, Resimler, Grafikler	iv
Tablolar	viii
Kısaltmalar ve Simgeler	ix
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. Testis Gelişimi	7
2.1.1. Testislerin İnışı	7
2.2. Testis Anatomisi	8
2.3. Testis Histolojisi	12
2.3.1. Seminifer Tübüller	14
2.3.2. Sertoli Hücreleri	15
2.3.3. Spermatogenik Hücreler ve Spermatogenezis	19
2.3.4. İntersitisyel Doku ve Leydig Hücreleri	28
2.4. Testis Fizyolojisi	29
2.5. Hipoksi	35
2.5.1. Hipoksik (Hipobarik) Hipoksi	36
2.5.2. Yüksek İrtifa ve Hipoksik Hipoksi	38
2.5.3. Düşük Oksijene Aklimatizasyon	38
2.5.4. Hipoksinin Etkileri	39
2.6. Ginkgo biloba	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırması	45
3.2. İmmünohistokimyasal Yöntem	46
3.3. TUNEL Yöntemi	48
3.4. Elektron Mikroskopik Yöntem	49
3.5. İstatiksel Yöntem	52

4.BULGULAR	54
4.1. İmmünohistokimyasal Bulgular	54
4.2. Yarı-İnce Kesit Bulguları	57
4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular	59
4.4. İstatistiksel Bulgular	63
5.TARTIŞMA	105
6.SONUÇ	127
7.ÖZET	129
8.SUMMARY	131
9.KAYNAKLAR	133
10. EKLER	144
EK-1: Etik Kurul Raporu	
EK-2: Sertifika	
11. TEŞEKKÜR	146
12.ÖZGEÇMİŞ	147

ŞEKİLLER, RESİMLER ve GRAFİKLER

Şekiller

Şekil 1: Leydig hücresinde testosteron sentezi	30
---	----

Resimler

Resim 1A, 1B: Gelişimin 7. günü kontrol grubuna ait testis kesitinde PCNA primer antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400, x1000)	69
Resim 2A, 2B: Gelişimin 7. günü hipoksi grubuna ait testis kesitinde PCNA primer antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400, x1000)	70
Resim 3A, 3B: Gelişimin 7. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan gruba ait testis kesitinde PCNA primer antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400, x1000)	71
Resim 4A, 4B: Gelişimin 14. günü kontrol grubuna ait testis kesitinde PCNA primer antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400, x1000)	72
Resim 5A, 5B: Gelişimin 14. günü hipoksi grubuna ait testis kesitinde PCNA primer antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400, x1000)	73
Resim 6A, 6B: Gelişimin 14. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan gruba ait testis kesitinde PCNA primer antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400, x1000)	74
Resim 7A, 7B: Gelişimin 21. günü kontrol grubuna ait testis kesitinde PCNA primer antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400, x1000)	75
Resim 8A, 8B: Gelişimin 21. günü hipoksi grubuna ait testis kesitinde	

PCNA primer antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400, x1000)	76
Resim 9A, 9B: Gelişimin 21. günü hipoksi+ Ginkgo biloba uygulaması yapılan gruba ait testis kesitinde PCNA primer antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400, x1000)	77
Resim 10: Gelişimin 7. günü kontrol grubuna ait testis kesitinde TUNEL yöntemi ile apoptozisinin belirlenmesi (TUNEL&Metil Yeşil x400)	78
Resim 11: Gelişimin 7. günü hipoksi grubuna ait testis kesitinde TUNEL yöntemi ile apoptozisinin belirlenmesi (TUNEL&Metil Yeşil x400)	79
Resim 12: Gelişimin 7. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan gruba ait testis kesitinde TUNEL yöntemi ile apoptozisinin belirlenmesi (TUNEL&Metil Yeşil x400)	80
Resim 13: Gelişimin 14. günü kontrol grubuna ait testis kesitinde TUNEL yöntemi ile apoptozisinin belirlenmesi (TUNEL&Metil Yeşil x400)	81
Resim 14A,14B: Gelişimin 14. günü hipoksi grubuna ait testis kesitinde TUNEL yöntemi ile apoptozisinin belirlenmesi (TUNEL&Metil Yeşil x400)	82
Resim 15: Gelişimin 14. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan gruba ait testis kesitinde TUNEL yöntemi ile apoptozisinin belirlenmesi (TUNEL&Metil Yeşil x400)	83
Resim 16: Gelişimin 21. günü hipoksi grubuna ait testis kesitinde TUNEL yöntemi ile apoptozisinin belirlenmesi (TUNEL&Metil Yeşil x400)	84
Resim 17: Gelişimin 21. günü hipoksi grubuna ait testis kesitinde TUNEL yöntemi ile apoptozisinin belirlenmesi (TUNEL&Metil Yeşil x400)	85
Resim 18: Gelişimin 14. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan gruba ait testis kesitinde TUNEL yöntemi ile apoptozisinin belirlenmesi	

(TUNEL&Metil Yeşil x400)	86
Resim 19: Gelişimin 7. günü kontrol grubuna ait testis kesitinde yarı-ince kesit görünümü	
(Toluidin Mavisi x1000)	87
Resim 20: Gelişimin 7. günü hipoksi grubuna ait testis kesitinde yarı-ince kesit görünümü	
(Toluidin Mavisi x1000)	88
Resim 21: Gelişimin 7. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan gruba ait testis kesitinde yarı-ince kesit görünümü	
(Toluidin Mavisi x1000)	89
Resim 22A, 22B: Gelişimin 14. günü kontrol grubuna ait testis kesitinde yarı-ince kesit görünümü	
(Toluidin Mavisi x1000)	90
Resim 23A, 23B: Gelişimin 14. günü hipoksi grubuna ait testis kesitinde yarı-ince kesit görünümü	
(Toluidin Mavisi x1000)	91
Resim 24A, 24B: Gelişimin 14. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan gruba ait testis kesitinde yarı-ince kesit görünümü	
(Toluidin Mavisi x1000)	92
Resim 25A, 25B: Gelişimin 21. günü kontrol grubuna ait testis kesitinde yarı-ince kesit görünümü	
(Toluidin Mavisi x1000)	93
Resim 26: Gelişimin 21. günü hipoksi grubuna ait testis kesitinde yarı-ince kesit görünümü	
(Toluidin Mavisi x1000)	94
Resim 27A, 27B: Gelişimin 14. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan gruba ait testis kesitinde yarı-ince kesit görünümü	
(Toluidin Mavisi x1000)	95
Resim 28A, 28B: Gelişimin 7. günü kontrol grubuna ait testis kesitinde elektron mikroskopik görünümü	
(Uranil asetat-Kurşun sitrat 28Ax6100, 22Bx12550)	96

Resim 29A, 29B: Gelişimin 7. günü hipoksi grubuna ait testis kesitinde elektron mikroskopik görünümü (Uranil asetat-Kurşun sitrat 29Ax6120, 29Bx12590)	97
Resim 30A, 30B: Gelişimin 7. günü günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan gruba ait testis kesitinde elektron mikroskopik görünümü (Uranil asetat-Kurşun sitrat 30Ax6360, 30Bx12540)	98
Resim 31A, 31B: Gelişimin 14. günü kontrol grubuna ait testis kesitinde elektron mikroskopik görünümü (Uranil asetat-Kurşun sitrat 31Ax6100, 31Ax12550)	99
Resim 32A, 32B: Gelişimin 14. günü hipoksi grubuna ait testis kesitinde elektron mikroskopik görünümü (Uranil asetat-Kurşun sitrat 32Ax6100, 32Bx12540)	100
Resim 33A, 33B: Gelişimin 14. günü günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan gruba ait testis kesitinde elektron mikroskopik görünümü (Uranil asetat-Kurşun sitrat 33Ax6120, 33Bx12590)	101
Resim 34A, 34B: Gelişimin 21. günü kontrol grubuna ait testis kesitinde elektron mikroskopik görünümü (Uranil asetat-Kurşun sitrat 34Ax6100, 34Bx12550)	102
Resim 35A, 35B: Gelişimin 21. günü hipoksi grubuna ait testis kesitinde elektron mikroskopik görünümü (Uranil asetat-Kurşun sitrat 35Ax6100, 35Bx12540)	103
Resim 36A, 36B: Gelişimin 21. günü günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan gruba ait testis kesitinde elektron mikroskopik görünümü (Uranil asetat-Kurşun sitrat 36Ax6120, 36Bx12590)	104

Grafikler

Grafik 1: Gruplara ve İzlem Zamanlarına Göre Seminifer Tübül Duvar Kalınlığı Düzeyleri	68
---	----

TABLÖLAR

- Tablo 1:** 7. Gün gruplarına ait seminifer tübül duvar kalınlığı ölçümlerine ilişkin tanımlayıcı istatistikler ve yüzdelik değerleri. 65
- Tablo 2:** 14. Gün gruplarına ait seminifer tübül duvar kalınlığı ölçümlerine ilişkin tanımlayıcı istatistikler ve yüzdelik değerleri. 66
- Tablo 3:** 21. Gün gruplarına ait seminifer tübül duvar kalınlığı ölçümlerine ilişkin tanımlayıcı istatistikler ve yüzdelik değerleri. 67

KISALTMALAR VE SİMGELER

ATP	: Adenozin Trifosfat
PO₂	: Oksijen Parsiyel Basıncı
PAF	: Platelet Aktive Edici Faktör
SRY	: Y Kromozomunun Cinsiyet Belirleyici Bölgesi
TDF	: Testis Belirleyici Faktör
MIS	: Müller Kanallarını Baskılayıcı Madde
a.	: Arteria
n.	: Nervus
µm	: Mikrometre
v.	: Vena
gl.	: Glandula
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
LH	: Luteinizan Hormon
Ad	: Koyu A Tipi
Ap	: Açık A Tipi
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
pg	: Pikogram
C	: Kromozomlardaki DNA miktarı
PAS	: Periyodik Asit Schiff
α	: Alfa
ABP	: Androjen-Bağlayıcı Protein
O₂	: Oksijen
Dak	: Dakika
mm Hg	: Milimetre Civa
N₂	: Azot
µ	: Mikron
PCNA	: Çoğalan Hücre Çekirdek Proteini
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre

KH_2PO_4 : Potasyum Fosfat Monobazik
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Sodyum Fosfat Dibazik
Sol. : Solusyon
kDA : Kilodalton
VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü

1.GİRİŞ

Yaşamın sürekliliği için besin maddelerine ek olarak su ve oksijenin de uygun miktarda alınması gereklidir. İnsan vücudu, besin maddeleri ve suyu depolayarak yaşamını belli bir süre sürdürebilir. Bu oksijen için geçerli değildir. Oksijen vücutta depolanamaz; sürekli olarak dış ortamdan alınması ve dokulara dağıtılması gereklidir.¹

Dokuların oksijenlenmesinde eksiklik, doku hasarına neden olmakta ve doku işlevini değiştirmektedir.² Dokuda oksijenin azalmasıyla birlikte enerji metabolizmasında değişiklikler oluşur; adenosin trifosfat (ATP) düzeyi azalır ve biriken adenosin molekülleri aşırı oranda yıkıma uğrar.³

Hipoksi, organizmada dokunun normal işlevlerini sürdürebilmesi için gereksinim duyduğu oksijenin yeterli düzeyde alınamaması ya da kullanılamaması durumudur.³

Yüksek irtifa hipobarik ve hipoksik bir ortamdır.⁴ Dünya üzerindeki birçok yerleşim bölgesi, yükseklik olarak kabul edilen 1000 m'nin üzerindedir ve bu bölgelerde milyarlarca insan yaşamaktadır.⁵ Ayrıca milyonlarca insan gerek iş gerekse gezi, eğlence ve sportif uğraşlar gibi çeşitli nedenlerle yüksek irtifalara çıkmaktadır.^{6,7} Günümüzde dağcılık, havacılık ve uzay ile ilgili bilimlerin geliştikçe, insan organizmasının yüksek irtifalardaki tepki ve uyumlarını incelemek daha da önem kazanmıştır.⁸

Yüksek irtifanın organizmada neden olduğu olumsuzlukların başlıca nedeni olan hipoksik (hipobarik) hipoksi ilk olarak Paul Bert tarafından tanımlanmış ve yıllardır yüksek irtifa ile ilişkili fizyolojik etkiler ve hastalıklar üzerinde çalışmalar yapılmıştır.^{4,6}

Yüksek irtifa ile ilişkili olan hipoksik (hipobarik) hipoksi, deniz düzeyinden yükseğe çıkıldıkça toplam barometrik basıncın azalması nedeniyle alveol havasında oksijen parsiyel basıncının (PO_2) düşmesi ile akciğerlerden kana geçen oksijen düzeyinin azalması ve sonuçta arteryel kanda PO_2 'nin düşmesi olgusudur.^{5,8,10,11}

Hipoksik (hipobarik) hipokside, solunum, dolaşım, öğrenme yetisi gibi birçok fizyolojik işleyiş etkilenmektedir.⁹ Hipoksik (hipobarik) hipoksi sonucu, akut dağ hastalığı, yüksek irtifa serebral ve pulmoner ödemi gibi rahatsızlıklar görülmektedir.¹² Görmede azalma, uyku bozuklukları, hiperventilasyon, hemoglobinin oksijene bağlanmasında azalma, sıvı ve elektrolit kaybı, hematolojik değişimler, vücut ağırlığında azalma ve büyüme geriliği hipoksik (hipobarik) hipoksi sonucu gerçekleşen olaylardır.^{4,13}

Hipoksik (hipobarik) hipoksi, hücrelerdeki antioksidan sistemi engelleyerek, serbest oksijen radikallerinin üretimini arttırmakta ve sonuç olarak biyomoleküllerin oksidatif hasarına neden olmaktadır.^{14,15} Hipoksi aynı zamanda platelet aktive edici faktör (PAF) miktarını da artırmaktadır.¹⁶

Doğum öncesi dönemde hipoksi sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Hipoksi süresi uzadığında, intrauterin gelişme geriliği görülmekte, perinatal mortalite ve morbidite oranı artmaktadır. Fötal gelişme geriliği ve miyadından önce doğumlar gerçekleşmektedir.¹⁷

Yüksek irtifada hipoksi, üreme sağlığını etkileyen önemli faktörlerden biridir.¹⁸ Hipoksik (hipobarik) hipoksi erkek üremesini olumsuz yönde etkilemektedir.^{19,20} Kaynak verilerinde hipoksik koşullar altında büyüme, gelişme ve üremeyi inceleyen birçok çalışma bulunmaktadır. Hipoksinin, erkek genital sisteminin en önemli organlarından biri olan testiste spermatogenezis ve androjen üretimi ile ilgili değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir.²¹ Hipoksinin testis gelişimine olan etkileri ile ilgili çalışmalar ise oldukça azdır.¹⁸

Hipoksi sonucu oluşan oksidatif stres hasarını ve serbest radikal etkilerini önlemek ereğiyle E vitamini, C vitamini, beta karoten, resveratrol, yeşil çay ekstraktı, selenyum, alfa lipoik asit ve Ginkgo biloba gibi antioksidanlar kullanılmaktadır.^{22,23}

Ginkgo biloba, dünyada yaşayan en eski ağaç türüdür. Yaşayan fosil olarak da adlandırılmaktadır.²⁴ Tohumları ve meyveleri Çin'de yüzyıllardır geleneksel tıpta tedavi amaçlı kullanılmaktadır.²⁵ Ginkgo biloba; serbest radikal tutucusu olarak antioksidan görevi yapan ve serbest radikallerin hasarını engelleyen, platelet aktive edici faktör üzerine antagonist etki gösteren, kan akımı ve mikrodolaşım üzerine olumlu etkileri ve nörotransmitterleri uyarıcı etkisi olan farklı birçok flavonoid glikozidleri ve terpenoidleri içermektedir.^{26,24} Ginkgo biloba'nın, sinir hücrelerini de koruduğu bildirilmiştir. Demans, hafıza kayıpları ve Alzheimer hastalığının

tedavi edilmesinde kullanılmaktadır.²⁷ Yapılan kaynak incelemelerinde kronik hipoksik gebe sıçanların yavrularında in vivo olarak doğum sonrası süreçte Ginkgo biloba'nın koruyucu ya da tedavi edici etkisinin tartışıldığı yapısal bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda, kronik hipoksiye etkin kalan gebe sıçanlardan elde edilen yavrularda, testis gelişimi ve doğum sonrası süreçte uygulanan Ginkgo biloba'nın bu gelişim üzerindeki olası etkilerinin immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik olarak incelenmesi amaçlandı. Bulgular kaynak verileriyle karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TESTİS GELİŞİMİ

İlkel gonadlar embriyonik 5. haftada ara (intermediyer) mezodermden farklılırlar. Önceleri ürogenital kabarıklığın ön-iç bölgesinde kölom epitelinin çoğalması ve altındaki mezenşimin yoğunlaşması ile bir çift genital (gonadal) şişkinlik oluşur.^{28,29,30,31} Gelişimin 6. haftasına değin genital şişkinliklerde germ hücreleri bulunmaz.^{28,30}

İlkel üreme hücreleri 4. haftanın başında vitellus kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında belirirler. Sonbağırsağın dorsal mezenteri boyunca ameboid hareketlerle ilerleyerek 5. haftanın başında genital şişkinliklere ulaşırlar ve 6. haftada içerisine girerler.^{28,29,30,31,32,33} Bu hücreler genital şişkinliklere ulaşamadıklarında gonadlar ileri farklılanamaz.²⁸ İlkel üreme hücrelerinin göçü ve çoğalması, bir tirozin kinaz olan c-kit reseptörünün hücre membranında bulunan kök hücre faktörü etkileşimine bağlıdır.³²

İlkel üreme hücrelerinin ilkel gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında genital şişkinliklerin epiteli çoğalır, epitel hücreleri altlarındaki mezenşimin içine gömülürler ve ilkel cinsiyet kordonları denilen düzensiz şekilli kordonlar yaparlar.^{28,29,30,31} İlkel cinsiyet kordonları yüzey epiteline bağlıdır ve ilkel gonadlar dışta korteks, içte medulla bölgelerinden oluşur.^{28,29,30,31,32}

Fötal gelişimin 7. haftasına değin, her iki cinsiyet için gonad tipi aynıdır. Buna farklanmamış gonad denir.^{28,29,30,32} Genetik olarak erkek embriyonun ilkel üreme hücreleri Y kromozomu içerir.^{28,33} Y kromozomu farklanmamış gonadda testis belirleyici etkiye sahiptir; Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinde bulunan SRY geni, testiküler gelişimi ve farklılaşmayı sağlayan testis belirleyici faktörü (TDF) kodlar.^{28,29,30,32,33,34} TDF etkisiyle, ilkel cinsiyet kordonları ikincil kordonları oluşturmak üzere çoğalarak medullanın derinliklerine doğru ilerlerler.^{28,29,30,34} Testis kordonları gonadın hilus bölgesinde dallanıp anastomoz yaparak rete testisi oluşturur. Gelişimin daha ileri evresinde testis kordonları, tunika albuginea adı verilen sıkı bağ dokusu ile yüzey epitelinden ayrılır.^{28, 29, 30}

Gelişimin 4. ayında testis kordonları at nalı biçimini alır ve rete testis ile devam eder.^{28, 30} Bu evrede testis kordonları, ilkel üreme hücrelerinden köken alan spermatogonyumları ve gonadın yüzey epiteli olan kölomik epitelden köken alan Sertoli hücrelerini içerir.^{28,30,32,34}

Testis kordonları arasında, genital şişkinliğin mezenşiminden köken alan Leydig (intersitisyel) hücreleri bulunur.^{28,30,32,34} Gelişimin 8. haftasında Leydig hücreleri testosteron üretmeye başlar.^{28,29,32,33}

Testis kordonlarının lümeni puberteye değin kapalıdır, pubertede açılarak seminifer tübülleri oluşturur. Seminifer tübüller, rete testis tübülleriyle birleşir ve daha sonra kanalize olan diğer genital organlara açılır.^{28, 30} Gelişimin ilerlemesi ile testis, mezonefrozdaki ayrılır ve kendi mezenterisi olan mezorşiyum ile asılı durur. Testis gelişiminin son aşamasında, yüzey epiteli yassılaşıp ve mezoteli oluşturur.^{29,30}

2.1.1. Testislerin İnişİ

Testisler 2. ayın sonunda ürogenital mezenter ile karın arka duvarına bağlı durumdadır. Mezonefrozun gerilemesiyle, bu bağlar gonadın mezenteri haline gelir. Mezenterin kaudali gelişerek kaudal genital ligament adını alır.^{28,30} Testisin kaudal kutbundaki bu ligament, gubernakulum adını alarak ekstrasellüler matriksten zengin, yoğun mezenşimal bir yapı olarak aşağıya doğru uzanır.^{28,29,30,34,35}

Testislerin inişinden önce gubernakulum, karın ön duvarının gelecekte inguinal kanalı oluşturacak bölgesinden oblik olarak geçer, internal ve eksternal abdominal oblik kasların arasında sonlanır.^{28,29,30,32,35} Testis inguinal halkaya doğru inmeye başlarken, gubernakulum'un ekstraabdominal parçası inguinal bölgeden skrotal şişkinliğe doğru büyür ve gubernakulum'un ekstraabdominal kısmı skrotum'un tabanına değinir.^{28,30} Gubernakulum'un, testis'i skrotum'a bağladığı ve testisin skrotum'a inişte önderlik ettiği kabul edilmektedir.^{28,29,35}

Processus vaginalis (vajinal proses), peritonda karın ön duvarının orta hattının her iki yanında oluşan bir çift evaginasyondur.^{28,29,30,35} Skrotal şişkinliğe doğru ilerleyen vajinal proses, kanalis inguinalis'i (inguinal kanalı) oluşturur.^{28,29,30,35,36}

Testisler gebeliğin 12. haftasında inguinal bölgeye ulaşırlar.²⁸ 28. haftada inguinal kanallardan geçerek, 32. haftada periton ve vajinal proses arkasından skrotuma inerler.^{28,29,30,32,35} Testislerin inguinal kanaldan geçişine, karın içi organların büyümesi sonucu oluşan

intraabdominal basınçtaki artış yardımcı olur.^{28,29,30} Bu sürecin, fetal testislerce üretilen androjenler ve Müller Kanallarını baskılayıcı madde (Mullerian inhibiting substance; MIS) tarafından düzenlendiği düşünülmektedir.^{28,29,30,32}

Yeni doğanların %97'den fazlasında testisler skrotum içerisinde bulunur. Doğumdan sonra ilk üç ayda, inmemiş testislerin çoğu skrotuma iner.^{28,29,30} Bebeklerin %1'inden azında testislerden biri ya da ikisi hiçbir zaman skrotuma ulaşamaz. Bu durum kriptorşidizm olarak adlandırılır.²⁸ Her iki testis de karın boşluğunda ya da onun dışında kalmış ise, organlar olgunlaşamaz ve yaygın olarak kısırlık gözlenir.²⁹

2.2. TESTİS ANATOMİSİ

Testisler, skrotum içerisine yerleşmiş, sperm üretmekle görevli, yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda, 2,5 cm eninde, 3 cm kalınlığında ve 10-14 g ağırlığında oval şekilli bir çift organdır.^{30,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44} Skrotum içinde duruşları vertikal olmayıp, organın uzun eksenini yukarıdan aşağı ve önden arkaya eğiktir.³⁷ Genellikle sol testis sağ testise karşın daha aşağı yerleşimlidir.^{30,36,37,38,41,45}

Testisler, funiculus spermaticus'a asılıdır.^{36,40} Funiculus spermaticus'da, ductus deferens, a. ductus deferentis, plexus ductus deferentis, a. testicularis, plexus testicularis, plexus pampiniformis, a.cremasterica, n. genitofemoralis'in ramus genitalis'i ve lenf damarları bulunur.^{36,39,40,47} Kıvrımlı bir deri kesesi olan skrotum'un iç yüzü, septum skroti (skrotal septum) ile ikiye ayrılır.^{37,46}

Her bir testisin facies medialis ve facies lateralis olarak iki yüzü; margo anterior ve margo posterior olarak iki kenarı, extremitas superior ve extremitas inferior olmak üzere iki ucu vardır.^{30,37,38,41,42}

Testis dıştan içe; tunica vaginalis'in lamina visceralis'i (epiorchium), tunica albuginea ve tunica vasculosa olarak üç kılıf ile sarılıdır.^{37,39,41,48}

Tunica vaginalis, testisin büyük bölümünü saran periton katlantısı olup, embriyonik processus vaginalis'in distal kalıntısıdır.^{30,35,36,40,42,49} Tunica vaginalis; skrotum'un iç yüzünü döşeyen lamina parietalis (periorchium) ve testisi saran lamina visceralis (epiorchium) olarak iki katmandan oluşur.^{30,35,42} Lamina visceralis (epiorchium), epididymis'in büyük kısmı ile arka kenarının medial bölümü dışında, testis'i sarar ve bu iki yapıyı birbirine bağlar. Lamina parietalis (periorchium), periton'un fascia spermatica interna'yı döşeyen kısmıdır.^{39,49} Tunica vaginalis'in iki katmanı arasında kalan aralığa cavum serosum scroti denir ve içinde eklem sıvısına benzer, testislerin serbest hareketini sağlayan kaygan bir sıvı bulunur.^{36,39,40}

Tunica albuginea, lamina visceralis'in altında testis'i dıştan saran mavimsi beyaz renkli, fibröz bir katmandır.^{30,35,38,39,42} Tunica albuginea, arka kenarında mediastinum testis adı verilen kalın ve vertikal bir bölme oluşturur.^{30,35,39,41,42} Mediastinum testis, organa damar, sinir ve kanalların girip çıktığı bölgedir.^{38,39} Mediastinum testis'den testis içine giren uzantılara septula testis denir.^{30,35,39,41,42} Septumlar, testisin derinliklerine doğru ışınal uzanarak organı piramidal şekilli 250-300 lobçuğa (lobuli testis) ayırır.^{30,35,37,39,41,42,45} Lobuli testislerin taban kısımları perifere, tepe

kısımları ise mediastinum testis'e yönelmiştir.³⁹ Her lobçuk 1-4 tubuli seminiferi contorti (seminifer tübül) denilen kıvrıntılı tüplerden oluşmaktadır.^{34, 35,39,41,42,45,50,51} Testisteki 250-300 lobçukta yaklaşık 600-1000 adet seminifer tübül bulunmaktadır.⁴¹ Bu tübüllerin uzunlukları 30-80 cm, çapları 150-250 µm'dir.^{34,50,51}

Kıvrıntılı seyir gösteren seminifer tübüller kör bir ucla başlar, lobçukların mediastinum testis'e bakan kısımlarında düzleşip, birbirleriyle birleşerek sayıları 20-30'a iner.^{35,37,39} Tubuli seminiferi recti denilen bu kısa düz kanalların çapları genişleyerek 0,5 mm olur.³⁹ Tubuli seminiferi recti'ler mediastinum testis'e uzanarak ve birbirleriyle anastomoz yapar ve rete testis'i (Haller ağı) oluşturur. Rete testis, mediastinum testisin üst bölümünde sayıları 12-15 arasında değişen ductuli efferentes'lere açılır. Ductuli efferentesler, tunica albuginea'yı delerek testis dışına çıkarlar.^{35,37,39}

Tunica vasculosa, tunica albuginea'nın iç yüzünü ve lobçukları döşeyen damar ağı katmanıdır.^{37,39,41,46} Damarlar arasında gevşek bağ doku bulunur.³⁹

Testis'in Damarları, Lenf Dolaşımı ve Sinirleri

A. Testicularis: A. testicularis, a. renalis'in hemen altında aorta abdominalis'ten ayrılır.^{35,36, 39,40,41, 52} Eğik seyrederek retroperitoneal bölgeye (peritoneum dışı veya arkası) geçer, ureter'i ve a. iliaca externa'nın alt bölümünü çaprazlar.^{36,40} A. testicularis, funiculus

spermaticus'a katılır ve testisin arka kenarından (margo posterior) organ içerisine girerek mediastinum testis'te birçok dala ayrılır.⁴¹

V. testicularis: Testis'in arka kenarından çıkan yaklaşık 12 adet vendir. Bunlara epididymis'ten gelen dallar da katılır ve plexus pampiniformis denilen, funiculus spermaticus'daki yapıları saran bir ağ oluşturur. Plexus pampiniformis ductus deferens içerisindeki spermium'ların vücut ısısına yakın bir ortamda kalmasını sağlar. Yukarı doğru çıktıkça birbirleriyle birleşen bu venler, canalis inguinalis'e girmeden önce birleşerek 3 veya 4 ven, karın boşluğuna girerken de 2 ven olarak uzanırlar.³⁹ Kısa bir uzanımdan sonra bu iki ven de birleşerek v. testicularis'i oluşturur. V. testicularis sağ tarafta v. cava inferior'a, sol tarafta v. renalis sinistra'ya açılır.^{39,41}

Lenf dolaşımı: Lenf damarları, yüzeysel ve derin olarak iki grupta toplanır. Yüzeysel lenf damarları tunika vaginalis'in yüzeyinde, derin lenf damarları ise testis ve epididymis'in içinde seyrederek ve funiculus spermaticus ile birlikte karın boşluğuna girerler.^{39,46} Sonuçta nodi aortici laterales ve nodi preaortici'ye açılırlar.^{42,46,52}

Sinirleri: Testis otonom sinirlerle sinirlendirilir.^{36,41} Testis'in otonom sinirleri, a.testicularis'in çevresindeki plexus testicularis'ten gelir. Plexus testicularis içerisinde n. vagus'tan gelen parasempatik lifler, medulla spinalis'in T 10-11. segmentlerinden gelen sempatik ve visceral afferent lifler bulunur.⁴⁰

2.3. TESTİS HİSTOLOJİSİ

Erkek üreme sistemi; testisler, testis içi genital kanallar (tubuli rekti, rete testis, duktuli efferentes), testis dışı genital kanallar (duktus epididymis, duktus deferens, duktus ejakulatorius, uretra) ve bu kanallara açılan yardımcı bezler (vesikula seminalis, prostat, gl. bulbouretralis) ile penisten oluşur.^{30,32,41,43,50,51,53,54,55,56,57,58}

Testisler, skrotum içinde funikulus spermaticus ile asılı duran, septum skroti ile ayrılmış bir çift organdır.^{32,34,50,51,54,55,56,57,58} Doğum öncesi dönemde abdominal bölgede gelişen testisler, doğuma yakın inguinal kanaldan geçerek funikulus spermaticus ile asılı halde, skrotum'a inerler.^{28, 29, 32, 58, 59, 60} Testislerin bu yerleşimi, spermatogenezis için uygun sıcaklık ortamını sağlar.^{32,34,43,44,51,54,57,61,62,63}

Testisler, bileşik tubuler bez yapısında olup, ekzokrin ve endokrin salgı oluştururlar. Germ hücrelerinin oluşturulması, hormonların sentez ve salgılanması testislerin işlevleridir.^{30,50,51,53,54,55,56,57,58,64,65,66}

Testisler dıştan içe üç katman ile çevrelenmiştir.^{37,39,41,67}

1.Tunika vaginalis: Testislerin ön kenarı ve yan yüzlerini örten, peritondan köken alan çift yapraklı seröz bir zardır.^{30,34,44,50,51,53,54,55,57,64} Tunika vaginalis'in iç yaprağı (lamina visseralis) ile dış yaprağı (lamina parietalis) arasında periton boşluğuna bağlı seröz bir boşluk bulunur.^{50,54,57} Tunika vaginalis'in üzerinde içten dışa

doğru; musculus kremaster'in çizgili kas demetleri, gevşek bağ dokusu katmanı ve skrotum bulunur.^{54,57}

2. Tunika albuginea: Testisleri tamamen saran, kalın, fibröz kapsüldür.^{50,51,54,57} Kollajen demetler, uzunlamasına, enine ve çapraz yönde uzanırlar.^{54,57} Hücresel bileşenleri fibroblast ve miyofibroblastlar olan bu katman ritmik kasılma erkindedir.^{55,64} Tunika albuginea, testisin arka yüzünde, organın parankimasına doğru üçgen biçiminde kalınlaşarak mediastinum testis'i oluşturur.^{34,50,51,53,54,56,57,58,64} Kan ve lenf damarları, genital boşaltım kanalları testise, mediastinum testis'den girer ve çıkar.^{34,64}

3. Tunika vaskulosa: En içte bulunan bu katman, kan damarlarından zengin gevşek bağ dokusu yapısındadır.^{34,50,51,54,55,57,64}

Mediastinum testis'den ışınsal olarak testis içine uzanan ince fibröz bölmeler (septa), testisi yaklaşık 250 lobçuğa (lobuli testis) ayırır.^{32,50,51,53,54,56,57,58,68} Piramit şeklinde olan lobüllerin tabanları testisin dış yüzüne, tepeleri ise mediastinum testis'e dönüktür.^{50,54,57} Septumlar kesintili seyreder ve bu nedenle lobüller birbiriyle ilişkilidir.^{53,57} Her lobülün içinde, kör bir uçla başlayıp, sayıları 1-4 arasında değişen kıvrımlı tübüller olan seminifer tübüller (tubuli seminiferi kontorti, tubulus seminiferi konvolutus) ve bu tübüllerin arasını dolduran interstisyel bağ dokusu bulunur.^{32,34,50,51,53,54,57} Seminifer tübüller, lobüllerin mediastium testis'e bakan bölgesinde birleşerek, kısa, dar, düz seyirli kanalcıklar olan tubuli rekti'yi oluştururlar.^{34,51,54,57} Testis içi boşaltım kanallarından biri olan tubuli rekti; seminifer tübülleri, mediastinum içinde bulunan ve anastomozlaşmış bir kanal sistemi olan rete testis'e bağlar.^{34,50,53,54,57,64} Rete testis'ten 12-15 kadar duktuli efferentes çıkar ve tunika albuginea'yı delerek testis dışına çıkar. İleri derecede kıvrıntılı olan bu kanallar birbirleriyle birleşir ve duktus epididymis'i oluştururlar.^{50,53,54,56,57,64}

2.3.1.Seminifer Tübüller

Spermatogenezisin olaylandığı kıvrıntılı kanallar olan seminifer tübüllerin her biri yaklaşık 30-80 cm uzunluğunda ve 150-250 µm çapındadır.^{30,34,50,51,53,54,57,64} Her iki testiste ortalama 1000 kadar seminifer tübül bulunur. Bu tübüllerin toplam uzunlukları yaklaşık 0,5 km kadardır.⁵⁰

Seminifer tübüller, fibröz bağ dokusu kılıfı, gelişkin bazal membran ve çok katlı seminifer epitelden oluşur.⁵⁴ Seminifer epitel dıştan, tunika vaskuloza'dan köken alan bol damar ve sinir ağlarından zengin tunika propria (lamina propria) denilen fibröz bağ doku katmanıyla sarılıdır.^{50,64,67} Tunika propria, fibroblast hücre katmanları ve bu katmanlar arasında bulunan tip 1 kollajen liflerden oluşur.^{50,51,57} Bazal membrana yakın olan en iç katman (stratum myoideum) düz kas hücre özelliği gösteren myoid hücrelerden oluşmuştur.^{50,51,53,54}

Seminifer epitel, başlıca iki tip hücre içerir:

1. Sertoli ya da destek hücreleri (Epitheliocytus sustenans)
2. Spermatogenik hücreler ya da spermatogenik seri hücreleri (Cellulae spermatogenicae)

Spermatogenik seri hücreleri, çeşitli olgunlaşma aşamalarında bulunan hücreler olup, bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak şekilde 4- 8 kat şeklinde düzenlenmişlerdir.^{51,53,54,56,57}

2.3.2.Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, spermatogenik serideki hücreleri saran uzun, piramidal şekilli, apikal ve yan yüz farklanmaları içeren hücrelerdir. Tabanları bazal membrana otururken, apikal bölgeleri sıklıkla seminifer tübülün lümenine uzanır.^{32,34,50,51,53,64} Yan yüz bağlantıları ile spermatogenik serideki hücreleri çevrelediklerinden ışık mikroskobunda, Sertoli hücrelerinin sınırları ayırt edilememektedir.^{53,58} Sertoli hücreleri puberteye değin seminifer epitelin baskın hücre tipiyken, puberteden sonra seminifer tübül epitelindeki hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur.^{32,56,68} İleri yaştaki erkeklerde spermatogenik hücre topluluğu azaldığında, Sertoli hücreleri yeniden epitelin baskın hücresi olur.³²

Sertoli hücrelerinde çekirdek genelde bazalde yerleşik, büyük, oval ya da üçgen biçimli ve ökromatiktir.^{34,50,51,56,58,67,54,57} Çok sayıda girintiler içeren çekirdekte; ortada yerleşik, büyük, belirgin bir çekirdekçik bulunur.^{34,50,51,53,56,61} Sitoplazmada mikrotübüller ve ara filamanlardan oluşan gelişmiş bir hücre iskeletinin yanında, çok sayıda granülsüz endoplazmik retikulum, az sayıda granüllü endoplazmik retikulum, bol miktarda mitokondriyon, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, lipid damlacıkları, lipofuskin içeren lizozomlar ve glikojen granülleri bulunur.^{32,34,50,53,55,56,57,61} Ayrıca sitoplazmada protein yapıda oldukları düşünülen Charcot-Böttcher kristaloidleri denilen inklüzyon cisimcikleri vardır.^{34,50,51,55,56,67}

Sertoli hücreleri, üreme hücrelerine desteklik yapan zengin bir hücre iskeletine sahiptir.⁶⁸ Hücre iskeleti vimentin, düşük molekül

ağırlıklı sitokeratin 18 ve 19, gelişmiş aktin filaman ağı, ara filamanlar ve mikrotubuluslardan oluşur.^{32,64,61}

Sertoli hücrelerinin bazal yan yüzleri (bazolateral) birbirleriyle sıkı bağlantılar (zonula okludens) oluştururlar.^{32,34,51,50,55,61,68} Böylece seminifer tübüller, bazal kompartman ve adluminal kompartman olarak iki bölmeye ayrılır.^{32,34,50,51,55,61,67,68} Sıkı bağlantının alt kısmında yer alan bazal kompartman dardır ve lümeneye yakın olan adluminal kompartmanı çevreler.⁵⁰ Bazal kompartman, kan damarlarının lümenini, intersitisyel boşlukları ve spermatogonyumlar tarafından doldurulan bölgeleri kapsar.⁶⁴ Bazal kompartman içinde spermatogonyumlar, genç primer spermatositler, adluminal kompartman içinde ise olgun primer spermatositler, sekonder spermatositler ve spermatidler bulunmaktadır.^{34,51} Bu iki bölme spermatogenezis için bir mikro çevre sağlar.⁶⁴ Sertoli hücreleri, aralarında oluşturdukları sıkı bağlantılar ile lümen içi yapıları, bağ dokusunun etkisinden koruyan kan-testis bariyerini oluştururlar.^{56, 64} Kan-testis bariyeri, antikor dahil proteinlerin gelişmekte olan spermatogenik hücrelere ulaşmasını engeller. Cinsel olgunlaşma, bağışıklık yeteneğinin gelişmesinden çok sonra, pubertede olduğu için spermiyumlar bağışıklık sistemi tarafından yabancı (antijen) olarak tanınırlar. Bu nedenle farklı spermatogenik hücreler yabancı olarak tanınırlar ve bağışıklık yanıtı harekete geçerek üreme hücrelerine zarar verecek olan antikorları oluşturabilirler.⁶⁸ Ancak, kan-testis bariyeri, bağışıklık sistemi ile eşey hücreleri arasında her türlü etkileşimi ortadan kaldırarak, antikorların seminifer tübüllere geçmesini önler ve spermatogenik hücreleri otoimmün tepkilere karşı korur.^{50,56,68} Spermatositler ve spermatidler, bariyerin üzerinde, Sertoli hücrelerinin yan ve üst kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmişlerdir. Spermatidlerin kuyrukları geliştikçe, Sertoli hücrelerinin üst uçlarından çıkan flagellumlar saçaklar halinde görülürler. Sertoli hücrelerinin yan yüzlerinde bulunan

oluklu bağlantılar (gap junction) ile hücrelerin iyon ve kimyasal alışverişi sağlanır.⁵³

Sertoli hücreleri arasındaki bağlantı birimlerinde diğer epitelyum hücreleri arasında görülmeyen tipik özellikler vardır. Sıkı bağlantı bölgesinde, yan yana gelen hücre zarlarının birleşmesiyle elli ya da daha çok sayıda birbirine koştur hattın oluşması, sıkı bağlantı bölgesinde hücre zarına koştur yassılaştırmış endoplazmik retikulum sisternalarının bulunması, zar ile endoplazmik retikulum sisternaları arasında altıgen şeklinde düzenlenmiş aktin filamanlarının yer alması Sertoli hücreleri arasındaki bağlantı birimlerine özgü özelliklerdendir.^{34,51}

Sertoli hücrelerinin işlevleri:

Gelişmekte olan spermatogenik hücelere fiziksel destek ve besin sağlar. Seminifer tübül duvarında bazal kompartmandan lümene değin uzanan ve sitoplazmaları boyunca yakın ilişkide bulunduğu üreme hücrelerine hem destek olurlar hem de bazal membran ile ilişkisi olmayan ve damarlardan uzak olan bu üreme hücrelerine peritübüler kapillerden alınan besin maddeleri taşırlar.^{32,50,53,64}

Spermatogenik hücrelerin bazal membrandan lümene doğru hareketinde, mikrotübülleri ve mikrofilamanlarıyla etkin rol oynar.^{32,56,68}

Spermiyogenezis sonunda spermatid sitoplazması artık cisimler şeklinde atılır. Bu sitoplazmik parçacıklar Sertoli hücrelerindeki lizozomlar tarafından fagosite edilir ve sindirilir.^{32,50,51,53}

Oluşturdukları kan-testis bariyeri ile gelişmekte olan gametlerin immünolojik olarak tanınmasını engellerler.^{50,51} Spermatogonyumlar kanda bulunan maddelere kolayca ulaşabilir. Ancak, kan-testis bariyeri büyük moleküllerin Sertoli hücreleri arasındaki boşluğa taşınmasını önler. Böylece, spermatogenezisin ileri aşamalarındaki üreme hücreleri, kandaki zararlı maddelere karşı korunur.⁵³

Sertoli hücreleri sürekli olarak seminifer tübüllere, genital kanal yönünde akan ve spermiyum taşınması için gerekli olan androjen bağlayıcı protein salgılar. Androjen bağlayıcı protein üretimi, FSH ve testosteron hormonu denetimi altındadır. Androjen bağlayıcı protein Leydig hücrelerinden salgılanan testosteron'u bağlayarak, seminifer tübül içinde spermatogenezis için gerekli olan testosteron'un yoğunlaştırılmasını sağlar. Sertoli hücreleri testosteron'u östradiol'e çevirebilir. Bu hücreler aynı zamanda, hipofiz bezinin ön lobundan FSH sentezini ve salınmasını önleyen inhibin ve FSH salınımı üzerine olumlu etkisi olan aktivin adı verilen peptitleri salgılar. Testiküler transferrin'i sentezler ve salgırlarlar.^{53,54,67} Plazma transferrini ile gelen demir, Sertoli hücrelerinin bazalindeki reseptörlere bağlanır ve testiküler transferrin ile üreme hücrelerine iletilir.⁶⁴ Sertoli hücreleri, fruktozdan zengin, spermatogenik hücreleri besleyici ve taşınmasını kolaylaştırıcı salgı üretirler.⁵⁰

Embriyo gelişimi sırasında erkek fötüsde Müller kanalının gerilemesini sağlayan Müller Kanallarını baskılayıcı madde (MIS) salgılar.^{50,53,54}

Sertoli hücreleri enfeksiyon, kötü beslenme, X ışınlarına etkin kalma gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklı hücrelerdir ve bu zararlı etkilerle karşılaştıklarında canlı kalma oranları spermatogenik seri hücrelerine göre çok daha yüksektir.^{53,54}

2.3.3.Spermatogenik Hücreler ve Spermatogenezis

Spermatogenik ya da üreme hücreleri, Sertoli hücreleri ile birlikte seminifer tübül epitelini oluşturan, düzenli olarak çoğalarak olgun spermiyumlara farklanan hücrelerdir.^{34,51,53,67} Çeşitli olgunlaşma aşamalarında olan bu hücreler, bazaldan lümene doğru spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermiyum olarak sıralanır.^{32,50,51,54,57}

Spermatogenezis, seminifer epitelin bazal kompartmanında bulunan spermatogonyumlardan, olgun spermiyum oluşuncaya değin geçen çoğalma, büyüme, olgunlaşma ve farklanma evrelerini içeren bir gelişim sürecidir.^{28,34,51,57,61,64,68} Spermatogenezis, hormonal olarak denetlenir ve hipofizden salgılanan FSH ve LH'nın testis üzerindeki etkisine bağlıdır.^{34,53} FSH (folikül stimüle edici hormon) spermatogenik hücreleri uyatarak spermatogenezis'in düzenlenmesini sağlarken, LH (luteinizan hormon) Leydig hücrelerince testosteron salgılanmasını

denetler.^{34,54,57} Testosteron spermatogenik seri hücrelerinin gelişimi için gereklidir.⁵³

Puberteyle birlikte, spermatogenik hücrelerden spermiyumların farklanması başlar.^{28,29,34} Spermatogenezis ileri yaşlarda belirgin olarak azalır ancak yaşam boyu sürer.⁶³ Testiste günlük ortalama 300 milyon spermiyum üretilir.^{34,56} İnsanlarda spermatogonyumdan spermiyum oluşumu yaklaşık 64 gün sürer.^{28,53} Spermatogenezis, tüm seminifer tübüllerde ya da her seminifer tübül içinde aynı anda olaylanmaz. Bu nedenle, bir tübül kesitinin farklı alanlarında ve farklı tübül kesitlerinde, spermatogenezisin farklı aşamaları izlenebilir.⁵³

Spermatogenezis üç evreye ayrılır:

- 1.Spermatogonyal evre (Spermatositogenezis)
- 2.Spermatosit evresi (Mayoz bölünme)
- 3.Spermatid evresi (Spermiyogenezis)^{34, 51}

1.Spermatogonyal evre (Spermatositogenezis): Bu evrede spermatogonyumlar, mitoz bölünmeyle sayılarını arttıırırlar ve primer spermatositlere farklılırlar.^{34,51}

Spermatogonyumlar, bazal lamina üzerinde bulunan, yaklaşık 12 µm çapında, diploid kromozoma sahip küçük üreme hücreleridir.^{34,53,56} Puberteden başlayarak spermatogonyum hücreleri mitoz bölünme geçirerek spermatogonyum serilerini oluştururlar.^{53,64} İnsan spermatogonyumları, alışılğılmış histolojik kesitlerdeki görünüşleriyle üç tiptir. Bunlar; koyu A tipi (Ad=A dark) spermatogonyumlar, açık A tipi (Ap=A pale) spermatogonyumlar, B tipi spermatogonyumlardır.⁵⁰

Koyu A tipi (Ad) spermatogonyumlar: 12 µm çapında, küçük yuvarlak hücrelerdir.⁵⁰ Oval şekilli, heterokromatik çekirdekleri vardır. Seminifer epitelin kök hücreleridir. Mitoz bölünme ile çoğalarak, diğer koyu A tipi spermatogonyumları ve açık A tipi spermatogonyumları oluştururlar.^{34,50,51}

Açık A tipi (Ap) spermatogonyumlar: Oval şekilli, açık boyanan ökromatik çekirdeğe sahip hücrelerdir.^{34,51} Açık A tipi spermatogonyumlar, testosteron ile uyarılarak mitoz bölünmeler geçirir ve B tipi spermatogonyumlara dönüşürler.⁵⁰

B tipi spermatogonyumlar: Ortada yerleşik bir çekirdekçik çevresinde, büyük yoğunlaşmış kümeler oluşturan kromatin içeren çekirdeğe sahip hücrelerdir.^{34,51} Mitoz bölünmeler ile primer spermatositleri oluştururlar ve spermatogenezis tamamlanır.^{34,50,51}

Ad spermatogonyumlar bölünerek iki Ap spermatogonyum oluştururken, bölünen bu hücreler arasında ince sitoplazmik köprüler kalır. Sitoplazmik köprülerin nedeni, mitoz ve mayoz bölünmeler sırasında çekirdek bölünmesine sitoplazma bölünmesinin kısmen eşlik etmesidir.⁵⁰ Böylece, tek bir spermatogonyumdan oluşan primer spermatosit, sekonder spermatosit ve spermatid arasında bilgi aktarımı sağlanırken, seminifer tübülün bir bölümündeki spermiyumların gelişmesinde eş zamanlılık görülür.^{34,53} Spermatogenezis süreci tamamlandığında bu köprüler artık cisimler olarak atılır ve Sertoli hücrelerince fagositte edilirler.^{34,53}

Spermatogonyumların erkek üremesinde önemli etkileri vardır. Kök hücre özelliği gösteren spermatogonyumlar kısmen duyarsız hücrelerdir. Bu nedenle radyasyon ve kanser kemoterapisine dirençlidirler. Mitoz ile bölünen spermatogonyumlar, mayoz ile bölünen spermatositler ve farklılaşmakta olan spermatidler ise kanser kemoterapisine ve radyasyona duyarlıdır. Radyoterapi ya da kanser kemoterapisinin sonlandırılmasının ardından spermatogonyal kök hücreleri yeniden spermatogenik sürece girebilirler.³²

2.Spermatosit evresi (Mayoz bölünme): Bu evrede, primer spermatositler art arda iki mayoz bölünme geçirerek kromozom sayısını ve DNA miktarını yarıya indirirler ve haploid hücreler olan spermatidler oluşur.^{34,51}

Primer spermatositler spermatogenik serinin en iri ve en sık görülen hücreleridir.^{29,32,50,53} Bu hücreler büyük, veziküler bir çekirdek içerirler.⁵⁰ İnterfaz evresinde 4C DNA ve 46 (2n) kromozoma (44+XY) sahip olan primer spermatositler, birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girerler.^{32,34,50} n, haploid kromozom sayısını; C, bu kromozomlardaki DNA miktarını belirtmektedir. 1C; hücre başına yaklaşık 1,5 pg DNA'ya eşdeğerdir.^{32,68} Profaz yaklaşık 22 gün sürer ve kesintisiz olarak devam eden leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diyakinez evrelerinden oluşur.^{34,50,53,69,70} Leptoten evresinde, kromozomlar çekirdek içinde ince ve uzun iplikler halinde izlenir. Zigoten evresinde homolog kromozomlar yan yana gelir, kromozomlar sıkıca değinerek sinapsis oluştururlar. Homolog kromozomlar arasında, elektron mikroskopunda görülebilen bir yapı olan ve homolog kromozomların sabit olarak tutulmasını sağlayan sinaptonemal kompleks oluşur. Pakiten evresinde, kısalıp kalınlaşan kromozomlar, iki çift kardeş kromatidden oluşan tetratları

yaparlar. Bu evrede kardeş olmayan kromatidler arasında krossing-over denilen gen alışverişi başlar. Diploten evresinde krossing-over sonlanır. Kromatitler arasında birbirine değinen bölgeler olan kiyazma dışında, sinaptonemal kompleks eriyerek kromozomlar birbirinden ayrılır, ancak kardeş olmayan kromatidler, kiyazma aracılığı ile gevşek olarak birbirine bağlı kalır. Diyakinez'de kiyazmalar tetratin uçlarına doğru hareket eder ve çekirdek zarı bozulur.^{69,70}

Metafaz l'de homolog kromozomlar ekvatoryal düzlemde yerleşirler. Anafaz l'de kutuplara çekilen ve birbirinden ayrılan iki kromatidli kromozomlar, Telofaz l'de haploid sayıda kromozom içeren sekonder spermatositleri oluştururlar.⁵⁰

Oluşan sekonder spermatositler, primer spermatositlere karşın küçük hücrelerdir.^{50,53,54} Birinci mayoz bölünme sonunda primer spermatositin 4C DNA miktarı sekonder spermatositte 2 C'ye düşer.³² Sekonder spermatositler DNA'larını eşleştirmeden ikinci mayoz bölünmenin profazına girdiklerinden, seminifer epitelde sık gözlenemezler.^{32, 34, 50, 53} Birinci ve ikinci mayoz bölünmeler arasında DNA sentezi görülmediği için, ikinci mayoz bölünmeden sonra her bir hücredeki DNA miktarı yarıya iner (1C) ve haploid hücreler olan spermatidler oluşur.^{32,34,50}

Spermatositler, seminifer túbülün adlumunial kompartmanında yer alırlar. Bu nedenle mayoz bölünme kan testis bariyerinin içinde gerçekleşir.³²

3.Spermatid evresi (Spermiyogenezis): Bu evrede spermatidler, bir seri değişiklik geçirerek olgun spermiyumlara farklanırlar.^{34,51,57}

Spermatidler, sekonder spermatositlerden oluşan, 1C DNA içeren haploid hücrelerdir.^{32,34,50} Bu hücreler seminifer tübül lümenine yakın adluminal kompartmanda yer alır ve Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazma girintileri arasına gömülü olarak bulunurlar.^{32,50,53,54,56} Spermatidler yaklaşık 8  m çapında, küçük yuvarlak hücrelerdir. Sitoplazmalarında mitokondriyonlar, çekirdeğin yakınında yer alan iyi gelişmiş Golgi kompleksi, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar, granülsüz ve granüllü endoplazmik retikulum içerirler.^{50,53} Spermiyumlara dönüşme süreci boyunca spermatidler, bol hidrolitik enzim depolar ve organellerini azaltırlar, sitoplazmalarının bir kısmı atılır ve filagellum ve ilgili yapılar şekillenir.⁵⁰

Spermatidlerden spermiyuma farklandığı spermiyogenezis; akrozom oluşumunu, çekirdek yoğunlaşmasını ve uzamasını, filagellum gelişmesini ve sitoplazmanın atılmasını içeren karmaşık bir süreçtir.⁵³ Spermiyogenezis; Golgi, şapka (kep), akrozom ve olgunlaşma evresi olarak adlandırılan dört evreden oluşur.^{34,50,51}

Golgi evresi: Spermatidlerin granüllü endoplazmik retikulumunda üretilen hidrolitik enzimler, Golgi kompleksine gelir ve burada küçük proakrozomal granülleri oluştururlar.⁵⁰ Proakrozomal granüller glikoproteinden zengindir ve PAS (+) boyanırlar.^{34,50,51,53} Proakrozomal granüller daha sonra birleşerek, zarla çevrili akrozomal vezikülün içinde yer alan akrozomal granülü oluştururlar.^{33,53} Akrozomal

vezikül çekirdek zarına değinir. Akrozomal vezikülün bu yerleşimi, oluşacak spermiyumun ön kutbunu belirler.^{34,50,51} Aynı anda sentriyoller oluşan akrozomun karşı kutbuna göç ederler.^{33,53}

Şapka (Kep) evresi : Akrozomal vezikül büyüyerek çekirdeğin ön yarısına kadar yayılır ve çekirdek zarına tutunan bir şapka oluşturur. Akrozomal şapkanın altında yer alan çekirdek zarı porlarını yitirerek kalınlaşır. Çekirdek içeriği yoğunlaşır.^{34, 51}

Akrozom evresi: Çekirdeğin ön yarısına değin yayılan akrozomal vezikül ve akrozomal granül artık akrozom adını alır.⁵³ Akrozom; hyalurinidaz, nöraminidaz, asit fosfataz, proteaz gibi hidrolitik enzimler içerir. Akrozom bu nedenle özelleşmiş lizozom işlevine sahiptir.^{53,54}

Bu evrede spermatidler yerleşimlerini yenileyerek başlarını Sertoli hücrelerine gömerler. Gelişen filagellum ise seminifer tübül lümenine uzanır. Spermatidin yoğunlaşan çekirdeği yassılaşır ve uzar. Aynı anda akrozom, hücre zarının ön bölgesine hareket eder. Sitoplazmadaki mikrotübüller organize olarak silindir biçimini alırlar ve çekirdeği çevreleyen manşet oluşur.^{34,51}

Proksimal sentriyol, çekirdeğin arka kutbundaki yüzeyel bir oyuğa gömülür ve spermiyumun boyun kısmında kalır.³⁴

Spermatidin filagellumu distal sentriyolden gelişir.^{34,54,64} Filagellum keratin içeren dış yoğun liflerle sarılı merkezi bir aksonemden oluşur.^{32,50} Aksonem eş merkezli 9+2 mikrotübül içerir.^{32,34} Mitokondriyonlar gelişen aksonem boyunca göç eder, aksonemi silindirik biçiminde sararlar.^{32,34,50,51} Filagellum hareketi, mikrotübüller, ATP ve dinein denilen ATPaz yetisine sahip bir proteinin etkileşmesi ile olaylanır.⁵³

Olgunlaşma evresi: Spermatid sitoplazmasından oluşan artık cisimler Sertoli hücrelerince fagosite edilir. Sitoplazma ve sitoplazmik cisimlerin atılmasıyla hücreler arasındaki sitoplazmik köprüler de kaybolur.⁵³ Spermiyumlar, Sertoli hücrelerinden ayrılarak seminifer tübül lümenine salınır. Lümenine ulaşan spermiyumlar henüz dölleme yetisinden yoksundur ve hareket edemezler, hareket yeteneği duktus epididymis'te kazanılır.⁵⁰

Olgun spermiyumlar, haploid sayıda kromozomu bulunan ince, uzun hücrelerdir.⁵⁷ Baş ve kuyruk olarak iki ana bölümden oluşur.^{34,50,51,61}

İnsan spermiyumunun boyu yaklaşık 60 µm'dir.^{34,51,54,56} Çekirdek ile akrozomu içeren baş ve uzun bir kuyruk kısmından oluşur.⁶¹ Kuyruk; boyun (bağlayıcı parça), orta parça, esas parça ve son parçayı içerir.^{34,50,51,61}

Baş (Caput) : Baş, akrozomla sarılmış çekirdekten oluşur.³² Başın büyüklüğü ve biçimi tüm memeli türlerinde değişkenlik gösterir.⁵⁵ İnsanda uzunluğu 4-5 µm, genişliği 3 µm, kalınlığı 1 µm'dir.^{34,50 51} Çekirdek

yassılaşıp şekilli olup, yoğun kromatin içerir.^{32,57} Çekirdeğin ön yarısını akrozom örter. Akrozom, zar ile sarılı glikoprotein yapısında içeriğe sahiptir.^{32,34,50,55} Akrozom lizozomlarda da bulunan hidrolitik enzimler (proteazlar, asit fosfatazlar, hyaluronidaz, akrosin, nöraminidazlar) içerir.^{32,34,50} Bu enzimler, oositi çevreleyen korona radyata hücrelerini ayırır ve zona pellusidayı eritir. Spermiyumlar bir oositle karşılaştığında, akrozomun dış zarı birçok bölgede spermiyumun hücre zarı ile kaynaşarak akrozomal enzimlerin hücre dışına salınmasını sağlar. Bu işlem akrozomal reaksiyon olarak tanımlanır.^{34,50,51,53}

Kuyruk: Spermiyumda kuyruk; boyun (bağlayıcı parça), orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere dört kısımdan oluşur.^{34,50,51,61}

Boyun: Bir çift sentriyolün bulunduğu, ortalama 5 µm uzunluğunda olan, başı kuyruğa bağlayan dar bir parçadır.^{32, 50} Proksimal sentriyol çekirdeğe tutunmuş olarak bulunur. Distal sentriyol ise, spermiyum kuyruğunun merkezi parçası olan aksonemin kaynağını oluşturur.³² Distal sentriyolden çıkan mikrotübüller 9+2 biçiminde düzenlenerek aksonemi yaparlar.³⁴ Aksonemin çevresinde uzun eksene koşut seyreden kalın, 9 adet dış lifler bulunur.^{50,57}

Orta parça: Boyun ve esas parça arasında bulunur, ortalama uzunluğu 5-7 µm'dir.^{34,50,61} Aksonem kuyruğun merkezini kaplar.³² Aksonemin çevresinde 9 adet dış lifler, bunun da dışında kuyruğa enerji sağlamak ereğiyle, spiral şekilde dış lifleri saran uzunlamasına mitokondriyonlar yer alır. Orta parçanın bitiminde bulunan annulus (son halka) adı verilen fibröz kalınlaşma, mitokondriyonların esas parçaya

geçmesini engeller.⁵⁰ Annulus, orta parçanın esas parçaya dönüştüğü bölgedir.³²

Esas parça: Kuyruğun en uzun kısmı olup uzunluğu 40-45 μm 'dir.^{34,50,61} Annulustan son parçaya kadar uzanır ve mitokondriyon içermez. Esas parça; 7 dış lifle sarılı, aksonem ve bunları çevreleyen bir fibröz kılıftan oluşur.^{32,50}

Son parça: Uzunluğu 5 μm kadardır ve sadece plazma zarı ile sarılmış aksonemi içerir.^{32,34,50,51}

2.3.4. İntersitisyel Doku ve Leydig Hücreleri

İntersitisyel doku, seminifer tübüller arasında bulunan, ince kollajen ve retiküler lifler ile fibroblastlar, mast hücreleri ve makrofajlardan zengin gevşek bağ dokusudur.^{51,53,54,61} İçinde kan ve lenf damarları ile bunların çevresinde endokrin işlev gösteren, erkek cinsiyete farklanmayı sağlayıcı işleve sahip testosteron hormonunu salgılayan Leydig (intersitisyel) hücreleri bulunur.^{50,54,57}

Leydig hücreleri, 15-20 μm çapında, poligonal şekilli, merkezi bir çekirdek ve bir ya da iki çekirdekçiğe sahip hücrelerdir.^{50,53,54,55} Çekirdek ökromatiktir.⁵⁴ Leydig hücreleri steroid salgı yapan hücrelerin genel yapısal özelliklerini sergiler.^{53, 54} Eozinofilik sitoplazmalarında tübüler kristal mitokondriyonlar, bol granülsüz endoplazmik retikulum tubulusları, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, lizozomlar ve çok sayıda lipid damlacıkları

bulunur. Leydig hücre sitoplazmalarında, işlevleri bilinmeyen Reinke kristalleri denilen kristalize proteinler de görülür.^{34,50,51,54,56,61} Leydig hücreleri, yaş ilerledikçe artan lipofuskin pigmenti içerirler.^{54,56} Testosteron sentezi mitokondriyonlarda ve granülsüz endoplazmik retikulumlarda bulunan enzimlerce gerçekleştirilir.⁵³ Üretilen testosteron doğrudan kana verilir.⁶¹

İnterstitiyel hücrelerin işlevleri ve sayıları hormonal uyarılara bağlıdır. İnsanda hamilelik sırasında plasentadan üretilen gonadotropik hormon, maternal kandan fötüsa geçer ve androjenik hormonları üreten fötal testiküler interstitiyel hücreleri uyarır. Bu hormonlar, gelişim sırasında erkek genital organlarının farklanması için gereklidir. Embriyonik interstitiyel hücreler hamileliğin 4. ayına değin işlevseldirler. Daha sonra gerilerler. Hücreler puberte öncesi döneme değin inaktiftirler.⁵³ Pubertede testosteron hormonu spermiyum üretiminin başlatılması, yardımcı bezlerin işlevselliği ve ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişimi için; yetişkinlerde ise spermatogenezisin sürekliliği için gereklidir.³⁴

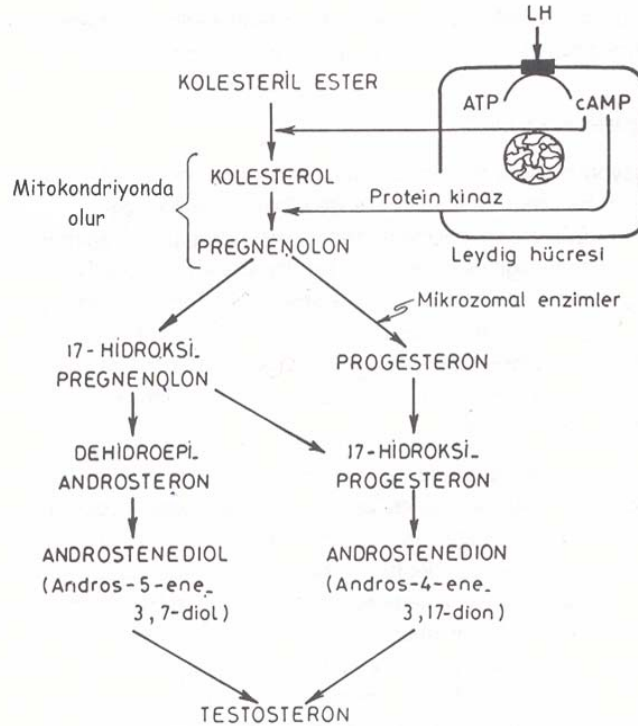
2.4. TESTİS FİZYOLOJİSİ

Testisin iki esas görevi cinsiyet hormonlarını ve spermiyumları üretmektir.^{51, 53, 55, 66}

Testisler, androjenler olarak tanımlanan testosteron, dihidrotestosteron, androstenedion gibi erkek cinsiyet hormonlarını salgılar.⁶³

Testosteron

Testosteron, steroid yapıda olup testiste üretilen başlıca hormondur ve Leydig hücrelerinde kolesterolden sentezlenir.^{11,33,43,53,54,63,71} Testosteron ayrıca progesteron yoluyla 17-hidroksiprogesterondan da sentezlenir, ancak insanlarda bu yoldan sentezi azdır.^{11,71} Testosteron salgılanması luteinizan hormonun (LH) kontrolü altındadır.^{11,44,63,71,72} LH'nın Leydig hücrelerini uyarması cAMP yoluyla olur. cAMP kolesterol esterden kolesterol oluşumunu artırır; protein kinazın aktive edilmesi ile de kolesterol pregnenolon'a dönüştürülür. Kolesterolden pregnenolon sentezi mitokondriyonda olaylanır; pregnenolon mitokondriyondan ayrılır ve mikrozomal enzimler aracılığı ile progesterona çevrilir. Leydig hücrelerinin endoplazmik retikulumunda progesteron önce androstenedion'a, androstenedion ise daha sonra testosteron'a dönüştürülür.⁷¹ (ŞEKİL 1)



ŞEKİL 1: Leydig hücresinde testosteron sentezi.⁷¹

Testosteron'un Taşınma ve Metabolizması

Plazmadaki testosteron'un %68' i albumin'e, %30'u cinsiyet hormonu bağlayıcı globulin'e olarak %98' i proteine bağlıdır.^{11,44} Bağlı hormonun dolaşım sisteminde kalış süresi 30 dakika ya da 1 saat, ender olarak ise daha uzundur. Süre sonunda, testosteron dokularda ya tespit olur ya da inaktif ürünlere dönüşerek vücuttan atılır. Dokulara tespit olan testosteron'un büyük kısmı hücre içinde dihidrotestosteron'a dönüştürülür. Bu olayın gerçekleştiği hedef organlar ise erişkinlerde özellikle prostat bezi, erkek fötusta dış genital organlardır.⁶³

Testosteron'un İşlevleri ve Etkileri

Testosteron genel olarak, vücutta belirgin erkek özelliklerinin oluşmasıyla yükümlüdür.⁶³ Gebelikte plasentadan üretilen gonadotropik hormon, fötusa geçer ve fötal Leydig hücrelerini uyararak testosteron sentezini sağlar.^{53,63} Üretilen androjenlerin varlığı erkek üreme organlarının embriyonik farklanması için gereklidir.^{33,53} Testosteron hormonu vücutta fötal gelişim döneminde ve doğumdan sonra bulunur. Çocukluk çağında ise, yaklaşık 10-13 yaşa değin testosteron üretilmez. Pubertede hipofiz ön lobundan salgılanan gonadotropik hormonlarının uyarısıyla testosteron sentezi hızla artar.⁶³ Testosteron erişkin dönem süresince yüksek düzeydedir, yaşlanmayla azalır.^{33,63}

Testosteron, spermatogenezis, embriyo ve fötusun gelişimi sırasında cinsel farklanma ve gonadotropin salgısının denetimi için gerekli bir hormondur.^{44, 53, 62}

Pubertede, testosteron salgılanmasının yeniden başlamasıyla penisin büyümesi, yardımcı genital bezlerin işlevselliği, ses kalınlaşması, pubis ve genel olarak vücut kıllanması, vücut yapısında gelişme, yağ bezi salgısında artış gibi ikincil cinsiyet özelliklerinde gelişme görülür.^{11,44,62,63,65,71,72}

Testosteron, proteinlerin sentezini artırırken, yıkımını azaltır. Sonuçta da büyüme hızında artışa ve kas gelişimine neden olur.^{11,63,71,72} Testosteron kemik büyümesini artırırken, epifiz plağının kapanması ile boy uzamasını sonlandırır.^{62,63,72} Normal eritrosit kütlelerinin sürdürülmesine yardımcı olarak eritropoietin sentezini ve eritroid öncüllerinin olgunlaşmasını ve böbrekte sodyum geri emilimini uyarır, karşı cinse ilginin ve libidonun başlamasını sağlar.⁶²

Testosteron'un Etki Mekanizması

Testosteron'un temel etkisi, hedef hücrelerde protein sentezini arttırmaktır.⁶³ Testosteron, diğer steroidler gibi hücre içindeki bir reseptöre bağlanır. Reseptör-steroid bileşiği çekirdek DNA'sına bağlanarak, çeşitli genlerin transkripsiyonunu kolaylaştırır.¹¹ Bazı hedef hücrelerde, testosteron hücre içinde 5 α - redüktaz enziminin aracılığı ile dihidrotestosteron'a dönüştürülür.^{11,63} Dihidrotestosteron, testosteronla aynı reseptöre bağlanır. Dihidrotestosteron dolaşıma da geçer, plazma düzeyi testosteron'un yaklaşık %10'u kadardır. Dihidrotestosteron oluşumu, testosteron'un hedef dokulardaki etkisini arttırmanın bir yoludur.¹¹

İnsanda, farklı genlerle kodlanan iki tip 5 α -redüktaz vardır. Tip 1 5 α -redüktaz, deride bulunur ve kafa derisindeki baskın enzimdir. Tip 2 5 α -redüktaz ise, üreme organlarının derisinde, prostat ve diğer üreme organlarında bulunur.¹¹

Testosteron-reseptör bileşkesi, Wolf kanal yapılarının olgunlaşmasından ve gelişimde erkeğe ait iç üreme organlarının oluşmasından sorumludur. Erkeğe ait dış üreme organlarının oluşması için dihidrotestosteron-reseptör bileşkesi gereklidir. Dihidrotestosteron-reseptör bileşkesi, pubertedeki prostat ve olasılıkla da, penis büyümesinden birinci derecede yükümlüdür; yüzdeki kıllanma, saç çizgisindeki temporal gerileme de bu bileşkenin etkisi ile olaylanır. Kas kitlesindeki artış ile erkekte cinsel dürtü ve libidonun gelişmesi ise, birincil olarak testosteron'a bağlıdır.¹¹

Testislerden Östrojen Salgılanması

Yetişkin erkek plazmasındaki östradiol'ün %80'inden ve östron'un %95'inden fazlası, dolaşımdaki testosteron ve androstenedionun aromatzasyonu ile oluşur; geri kalanı ise testis kökenlidir.^{11,62,63} Testis kökenli venöz kandaki östradiol'ün bir kısmı Leydig hücrelerinden, bir kısmı da Sertoli hücrelerinde androjenlerin aromatzasyonu ile oluşur.¹¹

Sertoli Hücresinden Salgılanan Proteinler

Sertoli hücrelerince salgılanan proteinler arasında taşıyıcı ve bağlayıcı proteinler, proteaz ve anti-proteazlar, büyüme faktörleri, hormonlar ve bazal membran bileşenleri bulunmaktadır.³³

Androjen-bağlayıcı protein (ABP), dihidrotestosteron'a ve testosteron'a yüksek özgünlük ile bağlanır.^{33,62} ABP üretimi folikül stimüle edici hormon (FSH) ve testosteron denetiminde gerçekleştirilir ve spermatogenezis için gerekli olan testosteron'un yoğunlaştırılmasını sağlar.^{53,54}

Sertoli hücreleri, embriyonik gelişim sırasında erkek fötusta Müller kanallarının gerilemesini sağlayan bir glikoprotein olan Müller Kanallarını baskılayıcı madde (Mullerian inhibiting substance; MIS) salgırlar.^{11,33,44,53,54,62} Bu hücrelerden aynı zamanda, hipofiz bezinin ön lobunda FSH sentezini ve salınmasını önleyen inhibin adı verilen bir peptid salgılanır.^{11, 43, 53, 54}

Sertoli hücreleri androjen sentezlemezler, ancak androjenlerin östrojenlere dönüştürülmesinden sorumlu olan aromataz (CYP19) enzimini içerdiklerinden östrojenleri oluşturabilirler.¹¹ FSH aromataz enzimini uyarır ve Leydig hücre kaynaklı androjenlerden östradiol üretilmesini sağlar.⁶²

Sıcaklığın Spermatogenezis Üzerine Etkileri

Spermatogenezisin düzenlenmesinde sıcaklık çok önemlidir. Spermatogenezis, ortalama 37°C olan vücut sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda olaylanır. Testislerdeki sıcaklık yaklaşık olarak 35°C'dir ve çeşitli düzeneklerle denetlenir.^{53,68} Zengin bir venöz ağ olan pampiniform pleksus testis arterlerini çevreler ve sıcaklığı dağıtmak için ters yönlü akımla sıcaklık değişimini sağlar.^{11,53,66,68} Soğuk bir ortamda, skrotum kası refleks olarak kasılarak testisleri yukarı doğru çeker, testislerin vücuda yaklaştırılması ile 2°C'lik farkın sürekliliği sağlanabilir.^{40,63,68} Bu şekilde, skrotum teorik olarak testislere özgül soğutma mekanizması olarak görev yapar.^{63,68} Sıcaklığın korunmasında bir diğer etken ise, terin skrotumdan buharlaşmasıyla ısı kaybıdır.^{53,66}

2.5. HİPOKSI

Oksijen karmaşık organizmaların yaşamını sürdürebilmesi için esas elementtir. Düşük ya da yüksek oksijen düzeyleri, strese bağlı biyolojik koşulların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.⁷³ Hücrelerin, işlevlerini yerine getirebilmek, çevreleriyle ve diğer hücrelerle olan ilişkilerini düzenlemek için gereksinim duyduğu oksijenin azalması durumunda dokularda hasar oluşur.⁹

Hipoksi, dokuların normal işlevinin sürekliliği için gereksinim duyduğu oksijenin yeterli düzeyde alınamaması veya kullanılamaması durumudur.^{3,10,11} Hipoksi, oksijen yetersizliğinin nedenlerine göre sınıflandırılır.

1. Hipoksik (Hipobarik) Hipoksi: Arter kanındaki parsiyel oksijen basıncının azaldığı durumda görülür.¹¹

2. Anemik Hipoksi: Düşük hemoglobin düzeyi ya da hemoglobinin oksijeni taşıyamaması nedeniyle kanın yeterli oksijeni taşıyamaması sonucunda görülür.⁶²

3. İskemik (Stagnant) Hipoksi: Parsiyel oksijen basıncı ve kanın oksijen taşıma yetisi normaldir, ancak dokuya ulaşan kan akımı çok düşük olduğu için dokuya yeterli oksijen sunumu yoktur.^{10,11}

4. Histotoksik Hipoksi: Dokuya salınan oksijen miktarı yeterlidir, ancak toksik bir etken nedeniyle doku kendisine ulaşan oksijenden yararlanamaz.¹¹

2.5.1.Hipoksik (Hipobarik) Hipoksi

Alveollerde çeşitli nedenlerden oksijen parsiyel basıncının (PO_2) düşük olduğu ve akciğerlerden kana geçen oksijen miktarının azalması durumunda arteriyel kanda PO_2 'nin düşmesine hipoksik hipoksi denir.^{5, 10, 11} Hipoksik hipoksi, çeşitli mekanizmalarla oluşur:

1. Yükseklik artışı ile solunan havada PO_2 'nin azalması: Yükseklik artışı ile havanın bileşimi değişmez, ancak toplam barometrik basınç düşer.¹¹ Böylece solunan havada, alveollerde PO_2 düşer, kanın O_2 ile satürasyonu da bozulur ve sonunda hipoksik hipoksi olaylanır.⁴

2. Hipoventilasyon durumları: Hipoventilasyon, solunum sayısında ya da derinliğindeki azalmadır. Bu durum, alveolar PO_2 'nin

azalmasına ve sonuçta arteriyel PO_2 'nin azalmasına neden olmaktadır. Kas zayıflığı ile ortaya çıkan akut nöromusküler hastalık olan Guillain-Barre sendromu gibi hastalıklarda hipoventilasyon olur.⁶²

3. Ventilasyon-perfüzyon dengesizliği: Klinikte görülen hipoksik hipoksinin en sık rastlanan nedenidir. Dinlenme sırasında, alveolar ventilasyon 4.2 L/dak, pulmoner kapiller kan akımı 5.5L/dak olduğundan, akciğerin tamamına ait ventilasyon/kan akımı (perfüzyon) oranı yaklaşık 0.8'dir. Ancak, yerçekiminin etkisinden dolayı normal akciğerin çeşitli bölgelerinde ventilasyon/perfüzyon oranı'nda belirgin farklılıklar vardır ve hastalıklarda yerel ventilasyon/perfüzyon oranı değişikliklerine sık rastlanır. Bir alveolün ventilasyonu, perfüzyonuna göre azalacak olursa bu alveole daha az oksijen geleceğinden alveoldeki PO_2 düşer. Akciğerlerde ventilasyon ve perfüzyonun orantısızlığı yaygınlaştığında, karbondioksit tutulumuna neden olabilir ve sistemik arteriyel PO_2 düşebilir.¹¹

4. Anatomik şantlar: Bazı konjenital kalp hastalıkları hipoksik hipoksiye neden olmaktadır. Bu anatomik şantlar çoğunlukla kalbin içinde gerçekleşir. Sağ atriyum veya ventriküldeki oksijenden fakir kan, septumu geçerek sol atriyum veya ventriküldeki kan ile karıştığında olaylanır. Sağdan sola şant, oksijenden fakir kan ile oksijenden zengin kanı karıştırır ve değişik derecelerde hipoksik hipoksi ile sonuçlanır.⁶²

5. Difüzyon anormallikleri: Alveolar-kapiller bariyerden oksijen difüzyonundaki anormallikler hipoksik hipoksi ile sonuçlanabilir.⁶²

2.5.2.Yüksek İrtifa ve Hipoksik Hipoksi

Yüksek irtifa hipobarik ve hipoksik bir ortamdır.⁴ Deniz düzeyinden yüksek irtifaya doğru çıkıldıkça barometrik basınç düşer.^{4,5} Barometrik basınç deniz düzeyinde 760 mm Hg iken, 3000 m'de 523 mm Hg olur, 15000 m'de ise 87 mm Hg'ya iner. Yüksek irtifa fizyolojisindeki tüm hipoksi problemlerinin temeli barometrik basınçtaki bu düşüştür.^{10,63} Barometrik basıncın azalmasına bağlı olarak gerek solunan havada, gerekse alveollerde oksijen parsiyel basıncı düşer ve kanın oksijen ile saturasyonu bozularak hipoksik hipoksi olaylanır.⁴ Deniz düzeyinde oksijen parsiyel basıncı 159 mm Hg iken 15000 m'de 18 mm Hg olur.^{10,63} Havanın PO₂'sinde düşme, yükseklik ile logaritmik bir ilişki gösterir. Böyle bir nedenle olaylanan hipoksiye yükseklik hipoksisi de denir.⁴

2.5.3.Düşük Oksijene Aklimatizasyon

Hipoksi durumunda dokuya gelen oksijen ya da dokunun kullanabildiği oksijen, gereksinimi karşılayamaz ve doku hipoksik koşullar altında çalışmaya başlar. Yeterince oksijen alamayan veya kullanamayan organizmada, hayatın sürekliliği için hipoksik koşullara fizyolojik bir uyum oluşur.^{4,10} Aklimatizasyon, organizmanın yüksekliğe yavaş yavaş uyum sağlamasıdır.⁵

Hipoksinin organizmaya etkileri yükseklik düzeyine, yüksekliğe çıkış hızına, kalış süresine, ortam sıcaklığına ve yapılan egzersizlerle birlikte kişisel faktörlere göre değişebilir.⁵ Kişi günlerce

haftalarca ya da yıllarca yüksek irtifada kalırsa giderek düşük PO_2 'ye aklimatize olur ve bu düşük oksijen vücutta daha az zararlı olur. Hipoksinin etkisinde olmadan şahıs daha çok çalışabilir ya da daha yükseklere çıkabilir.^{4,63} Deniz düzeyinde alveolar PO_2 104 mm Hg' dır. Bu değer 6000 m yükseklikte aklimatize olmamış kişide 40 mm Hg iken, aklimatize kişide 53 mm Hg' dır. Bu iki birey arasındaki fark aklimatize kişide ventilasyonun yaklaşık 5 kat artmasından kaynaklanmaktadır.⁶³

Aklimatizasyonun gelişmesine neden olan etkenler şu şekilde sıralanabilir.

1. Pulmoner ventilasyondaki büyük artış
2. Eritrositlerde çoğalma
3. Akciğerlerin difüzyon kapasitesinde artış
4. Dokuların damarlanmasında artış
5. Düşük PO_2 'ye karşın hücrelerin oksijen kullanma yeteneklerinde artış.⁶³

2.5.4.Hipoksinin Etkileri

Yüksek irtifada üreme süregelen bir sorundur. Basıncıdaki değişiklikler üreme sistemini etkilemektedir. Yüksek irtifa ya da yüksek irtifa ile ilişkili olan hipoksi ve düşük basınç, spermatogeneziste değişikliklere neden olmaktadır. Histolojik olarak incelendiğinde bu değişikliklerin sperm sayısında ve üremede azalmaya yol açtığı bildirilmiştir.⁷⁴ Peru tarihinde başkent olan 3507 m'deki Jauia'da yerli halktan olmayan insanlarda ve canlılarda büyük ölçüde üreme

sağlanamadığı için, deniz düzeyinde bulunan Lima şehri yıllar sonra başkent yapılmıştır.^{19, 74}

Hipoksinin bazı önemli etkileri yaklaşık 3600 m’de başlayan uyku hali, tembellik, zihin ve kas yorgunluğu, ender olarak baş ağrısı ve mide bulantısı şeklinde ortaya çıkar. Bütün bu belirtiler 4000 m üzerinde kas kasılması ve 6900 m üzerinde ise aklimatize olmamış kişide komaya kadar gider. Hipoksinin en önemli etkilerinden biri mental yeteneklerin ve buna bağlı olarak karar verme, bellek ve ince motor hareketlerin giderek azalmasıdır. Aklimatize olmamış kişi 4500 m’de bir saat kalırsa mental yetenekleri normalin yaklaşık %50’sine, 18 saat kalırsa yüzde %20 kadarına iner.^{10,63}

Hipoksi, tüm kaslarda iş yetisini de düşürür. Yetinin azalması iskelet ve kalp kasında gözlenir. Genel olarak iş yetisi, vücudun alabileceği en yüksek oksijen miktarının azalmasıyla doğru orantılı olarak düşer.⁶³

Hipoksi etkisi, kendini hücre düzeyinde gösterir. Yetersiz oksijen alan hücreler normal işlevlerini sürdüremezler.⁴ Oksijen azalmasında etkilenen en önemli hücresel yapılardan biri mitokondriyonlardır.² Hipoksi sonucunda hücresel adenozin trifosfat (ATP) düzeyi azalmakta, biriken adenozin molekülleri aşırı oranda yıkıma uğramakta, enerji üretimi ve kullanımı arasındaki denge bozulmaktadır.^{2,3} ATP kaybı iyonik dengesizliğe, asidoza, proteaz ve fosfolipazların aktivasyonuna neden olmaktadır. Membran akışkanlığının azalması, hücre membran geçirgenliğinin artması ve hücre içi pH’nın azalması hipoksi sırasında gözlenen diğer değişikliklerdir.²

Hipoksi çeşitli hücrelerde serbest oksijen radikallerinin üretimini arttırmaktadır.¹⁵ Organizmada oksidatif mekanizmalar sonucu serbest oksijen radikalleri oluştuğundan sonra radikal tepkime dizileri başlar.^{3,75} Eğer bir serbest radikal, radikal olmayan bir molekülle tepkimeye girerse, tepkime zincirlerini başlatır.⁷⁵ Serbest oksijen radikalleri, aşırı üretimleri veya vücuttaki oksidan/antioksidan dengesinin bozulması durumunda, hücrede protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi biyomoleküllerin oksidatif hasarına neden olurlar.^{3,75} Özellikle çoklu doymamış yağ asitleri, serbest oksijen radikallerinin zararlı etkisinden daha hızlı etkilenir ve serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Membranlar çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin oldukları için serbest oksijen radikali etkisine açıktırlar ve membranda yapı ve işlev bozuklukları oluşmaktadır.^{3,76} Sonuç olarak membranın bütünlüğü ve geçirgenliği bozulur ve hücre hasarı tetiklenmiş olur.²

Hipoksi serbest oksijen radikal hasarı yanında aynı zamanda platelet aktive edici faktör (PAF) miktarını da artırmaktadır.¹⁶ Oluştuktan hemen sonra salınırlar, yangısal tepkimelerin çoğunda etkin olduğu gözlenen bir substrattır.^{75,77} PAF, organizmada trombosit, lökosit, makrofaj, eozinofil, monosit ve endotel gibi çeşitli hücrelerin zarlarındaki PAF reseptörlerine bağlanarak etki göstermektedir.^{2,75,77} Organizmada birçok doku üzerinde PAF reseptörleri bulunur. İnsan trombositleri yüzeyinde de PAF reseptörleri olduğu belirlenmiştir.⁷⁷ PAF'ın reseptörlerine bağlanmaları sonucunda trombositlerin etkin hale geldiği ve hücrelerde biçimsel değişikliğe, birikime, granül içeriğinin salınmasına neden olduğu saptanmıştır.^{75,77} PAF, trombosit aktivasyonunun yanı sıra, nötrofil birikimini, süperoksit radikal üretimini, lizozomal enzimlerin salınımını ve lökotrien sentezini uyarmaktadır.²

Canlı hücrede bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen ya da geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir. Antioksidan savunma elemanları hücre içi ve hücre dışı ortamda farklıdır. İnsanda belli başlı hücre içi antioksidanlar süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleridir. Hücre dışı ortamdan E ve C vitamini transferin, haptoglobin, seüloplazmin, albumin, bilirubin, P- karoten ve α -I antitripsin sorumludur.^{10,78} Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin yanında E ve C vitaminleri de hücre içi antioksidan özelliğe sahiptir. Bu vitaminler hücre membranında lipid peroksidasyon tepkimelerini kıran antioksidanlardır ve serbest radikallerin hücrelere hasar verici etkilerini önlerler.¹⁰

Artan oksidan molekülü vücutta daima belirli düzeyde bulunan doğal antioksidan moleküllerince etkisiz hale getirilmektedir. Sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidan gücü dengededir. Denge bozulursa oksidan moleküller organizmanın yapı taşları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açar.¹⁰

2.6. GİNKGO BİLOBA

Ginkgo biloba, dünyada yaşayan en eski ağaç türü olarak bilinmektedir, geçmişi 200 milyon yıldan fazladır ve yaşayan fosil olarak da adlandırılmaktadır.²⁴ Ağacın nesli, buzul çağında Çin'in güneydoğusu ve Asya'nın bir bölümü dışında yetiştiği tüm bölgelerde tükenmiştir.^{79,80} Ginkgoaceae ailesinden olan ve Çin'de yüzyıllardır sağlığı koruyucu

özelliği nedeniyle kutsal tutulan Ginkgo biloba, günümüzde kültürleri yapılarak korunmaktadır.^{80,81}

Ginkgo biloba'nın yaprakları ve tohumları, Alzheimer hastalığı, yorgunluk, bitkinlik, yükseklik hastalıkları, menstruasyon öncesi sendrom, zayıf serebral ve oküler kan dolaşımı gibi birçok durum ve hastalığın tedavisinde geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır.⁸² Bunun yanında astım, serebral ödem, Parkinson hastalığı, yaşlılığa bağlı serebrovasküler bozukluklar, kohlear sağırılık, hafıza ve uyku bozuklukları tedavisinde uygulanmaktadır.⁷⁷ Birçok organda değişik biçimlerde etki gösterir. Nörodejeneratif, duyuşal ve vasküler hastalıklarda koruyucu etkisi vardır. Moleküler, hücreşel ve dokusal düzeyde veya tüm organizmada etki gösterebilir.⁷⁵

Ginkgo biloba; serbest radikal tutucusu olarak antioksidan görevi yapan ve serbest radikallerin hücre zararına yaptığı hasarı engelleyen, Platelet aktive edici faktöre karşıt etki gösteren, kan akımı ve mikrodolaşım üzerine olumlu etkileri ve nörotransmitterleri uyarıcı etkisi olan farklı birçok flavonoid glikozidleri ve terpenoidleri içermektedir.^{24,26}

Ginkgo biloba ekstraktı, Platelet aktive edici faktör'ü (PAF) antagonize eder, serbest radikal uzaklaştırıcı aktivite gösterir ve vasküler relaksasyon sağlar.⁷⁵ Ginkgo biloba ekstraktında bulunan ginkgolidler ve özellikle ginkgolid B, özgün ve etkili PAF antagonistidirler.^{79, 81} Ginkgolidler PAF reseptörlerini yarışmalı olarak antagonize ederler ve PAF'a bağılı trombosit birikimini önler, lizozomal zarları sabitleşler.^{2,75,81} Bu nedenle iskemi-reperfüzyon sonrası oluşşan doku hasarına katkıda bulunan PAF'ın etkisini ortadan kaldırarak doku hasarına engel olduğı gösterilmiştir.^{2,81}

Ginkgo biloba'nın antioksidan etkisi en yararlı farmakolojik etkisidir. Ginkgo biloba'nın koruyucu etkileri zarlar, DNA ve sitoplazmik protein gibi farklı hücresel hedefler üzerinedir.⁸¹ Ginkgo biloba ekstraktı, serbest radikal tutucu etkinliğe sahiptir. Ginkgo biloba ekstraktının radikal tutucu etkisi, içerisinde flavonoidik bileşiklerin bulunmasına bağlıdır.² Serbest radikallerle birleşerek, serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerini önlemektedir.⁷⁷

Çalışmada kullandığımız Ginkgo biloba ekstraktı, bu ağacın yapraklarının ekstraksiyonu sonucu elde edilen ve standardize edilmiş bir üründür.² Bu ekstrakt içinde flavonoidler %24, terpenoidler %6 (%3.1 ginkgolidler, %2.9 bilobalidler) ve %5-10 organik asitler bulunmaktadır.^{75,79,81} Flavonoidler; kaempferol, quercetin, isorhamnetine ve proanthocynidines içerirken, terpenoidler ginkgolid A, B, C, az oranda ginkgolid J ve bilobalid içermektedir.^{79,81,83}

Bilinen bu etkileri nedeniyle ekstrakt, günümüzde PAF ve serbest radikallerin rol oynadığı patolojik durumların tedavisinde kullanılmaktadır.^{2,81}

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden sağlanan Wistar albino cinsi gebe sıçanlar kullanıldı. Deneklerin bakım odasında ısı 21-23 °C ve ışık/zaman ayarı 14/10 saat olarak belirlendi.

Çalışmada; gelişimin 7., 14., 21. gününde olarak Wistar albino sıçanlardan, her grupta 6 sıçan olacak şekilde 9 grup oluşturuldu;

1. Grup: Gelişimin 7.günü Kontrol grubu (n=6)
2. Grup: Gelişimin 7. günü Hipoksi grubu (n=6)
3. Grup: Gelişimin 7. günü Hipoksi + Ginkgo biloba uygulaması yapılan grup (n=6)
4. Grup: Gelişimin 14. günü Kontrol grubu (n=6)
5. Grup: Gelişimin 14. günü Hipoksi grubu (n=6)
6. Grup: Gelişimin 14. günü Hipoksi + Ginkgo biloba uygulaması yapılan grup (n=6)
7. Grup: Gelişimin 21. günü Kontrol grubu (n=6)
8. Grup: Gelişimin 21. günü Hipoksi (n=6)
9. Grup: Gelişimin 21. günü Hipoksi + Ginkgo biloba uygulaması yapılan grup (n=6)

Hipoksi, %10'luk O₂, %90'lık N₂ gaz karışımı kullanılarak, hipoksik kamarada oluşturuldu. Vajinal plak oluşumu görülen sıçanlar gebeliğinin 0. gününde kabul edildi. Sıçanlar gebeliğin 5. gününde %10'luk O₂ ve %90'lık N₂ gaz karışımı verilen hipoksik kamaralara konuldu ve 10 gün süresince bu koşullara etkin bırakıldı. Kontrol grubu olarak belirlenen sıçanlar gebelikleri süresince normal atmosfer koşullarında tutuldu. Doğumun gerçekleşmesi ile birlikte, Ginkgo biloba uygulanan gruptaki yavrulara her gün aynı saatte 100 mg/kg Ginkgo biloba ekstresi ağız yoluyla uygulandı ve tüm deneklerin deney süresince vücut ağırlıkları ölçüldü.

Belirlenen günlerde (7., 14. ve 21. günler) denekler intramusküler ketamin (45 mg/kg) ve ksilazin (5 mg/kg) enjeksiyonu ile uyutularak ötenazi gerçekleştirildi. Ötenazi sonrası deneklerin karın bölgeleri açılarak testis dokuları alındı. Alınan dokular elektronmikroskopik inceleme için pH 7,4'de 1/15 µ fosfat tamponlu %2,5'luk gluteraldehit tespit solüsyonu içine konuldular. Işık mikroskopik inceleme için 1 cm³ büyüklüğünce kesilen doku parçaları %10'luk nötral formalinde 72 saat, tespit edildiler. Daha sonra alışlagelmiş izleme yöntemlerden geçirilerek parafine gömüldüler.

3.2. İmmünohistokimyasal Yöntem

%10'luk Nötral formalin ile tespit edilen kontrol ve deney gruplarına ait dokular alışlagelmiş ışık mikroskop izleme yönteminden geçirilerek parafin bloklar elde edildi. Hazırlanan bloklardan polizimli lamlara, 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Çalışmada testiste hücre çoğalmasını belirleyebilmek ereğiyle anti - PCNA fare monoklonal antikoru

(PC10, Cat: MS- 106-P1, Lot: 106P812D, Thermo) ve streptavidin-biyotin indirekt immünohistokimyasal yöntemeye uygun kit (Ultravision Detection System Anti-Mouse HRP, Cat: TM- 125- HL, Lot: MHL90115, Thermo) kullanıldı.

Kesitler 37°C'deki etüvde bir gece tutulduktan sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak amacıyla etüv ısısı 57°C'ye çıkarılarak 1 saat daha bekletildi. Camlar, deparafinizasyonu tamamlamak ereği ile 2 kez 15'er dakika ksilolde bekletildikten sonra sırasıyla %100'lük, %96'lık ve %80'lik alkol serilerinden 10'ar dakika geçirilerek, 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi ve alkolün uzaklaştırılması sağlandı.

Kesitler, doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılması ereğiyle mikrodalga fırında 1M sitrat tamponuna (pH: 6. 0) (Cat: AP- 9003- 500, Lot: 9003CT13610, Lab Vision) etkin bırakılarak retriver işlemi gerçekleştirildi. Oda ısısında 20 dakika soğutulduktan sonra 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit (Lot: K32805897 403, Merck) uygulandı ve endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Daha sonra, camlar 3 kez 3'er dakika PBS (Phosphate Buffer Saline) (Lab Vision) (pH: 7.4) ile yıkandı.

Yıkanan camlara 5 dakika Ultra V Block (Cat: TA- 125- UB, Lot: AUB81223, Thermo) uygulanarak özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan primer antikör aşamasına geçildi. Bu amaçla kesitler anti - PCNA fare monoklonal primer antikörüne [Thermo Scientific-PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Cat: MS- 106- P1, Lot: 106P812D, Thermo)] etkin bırakılarak 60 dakika oda ısısında bekletildi.

Camlar 60 dakikanın sonunda 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra 20 dakika biyotinli sekonder antikor (Cat: TM- 125- BN, Lot: MBN80811, Thermo) uygulandı ve sekonder antikorum primer antikora bağlanması sağlandı. Dokular PBS ile yıkandıktan sonra enzimin biyotine bağlanması ereğiyle 20 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine (Cat: TS- 125- HR, Lot: SHR80508, Thermo) etkin bırakıldı.

Camlar yeniden PBS ile yıkandıktan sonra kromojen olan AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) (Cat: TA- 125- HA, Lot: HA15141, Thermo) uygulanarak gözle görülebilen immün reaksiyonun açığa çıkması sağlandı. Zemin boyamasında Mayer'in Hematoksileni (Lot: OB524092, Merck) kullanıldı ve camlar Ultramount (Cat: TA-125-UG, Lot: VM13518, Lab Vision) ile kapatıldı. Kesitler Leica DCM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında değerlendirildi ve fotoğraflandı.

3.3.TUNEL Yöntemi

Hücrelerde DNA parçalanması ve apoptotik hücre ölümünün belirlenebilmesi ereğiyle in situ apoptozis saptama kiti (ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptozis Detection Kit, Lot: PSO1514711, Chemicon) kullanıldı. Parafin bloklardan polizinli lamlara, 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler 37°C 'deki etüvde bir gece bekletildi, daha sonra deparafinizasyon için etüv ısısı 57°C'lik etüvde 1 saat tutulan kesitler, deparafinizasyonu tamamlamak ereğiyle 2 kez 15'er dakika ksilol' e etkin bırakıldı. Daha sonra 10'ar dakika sırasıyla %100, %96 ve %80'lik etil alkol serilerinden geçirildi.

Kesitler, alkolden arındırılmak ereğiyle iki kez 5'er dakika distile sudan geçirildikten sonra 10 dakika 20 µg/ml proteinaz K ile inkübe edildiler. PBS ile yıkama aşamasından sonra 15 dakika %3' lük hidrojen peroksit (Lot: K32805897 403, Merck) ile etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. PBS ile yıkanan kesitler 10-15 dakika dengeli tamponda ve 60 dakika 37°C nemli ortamda TdT enziminde (77 µL Reaksiyon Buffer + 33 µL TdT Enzim) bekletildiler. Ardından oda sıcaklığında önceden ısıtılmış durdurma/yıkama tamponunda 10 dakika bekletildi ve Anti-Digoxigenin'in de 45 dakika inkübe edildiler. Her aşamada PBS ile dikkatle yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından TUNEL pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB ile boyama yapıldı. Zemin boyaması için 5 dakika süreyle Metil yeşili uygulandı.

Boyanan camlar artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildikten sonra, parlamaları ereği ile 20 dakika ksilolde bekletildi. Ardından entellan ve lamelle kapatılıp, bilgisayar donanımlı foto-ışık mikroskopta (DCM 4000, Leica, Germany) değerlendirildi.

3.4.Elektron Mikroskopik Yöntem

Tespit:

Sorenson' un fosfat solüsyonu:

Sol. A: Potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4)..... 0.908 g

Distile su.....100 ml

Sol. B: Sodyum fosfat dibazik ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)....1.188 g

Distile su.....100 ml

18.2 ml Sol. A + 81.8 ml Sol. B = 100 ml (pH: 7.4)

Gluteraldehit tespit solüsyonunun hazırlanması:

9.2 cc Sorenson fosfat tamponu+0.8 cc Gluteraldehit = 10 cc

Dokular, bu solüsyona 30 dakika etkin bırakılıp sertleşmeleri sağlandıktan sonra, bir çift bistüri yardımıyla 1 mm³'lük parçalara halinde ayrıldı. Bir saat daha gluteraldehit solüsyonunda bekletilerek ilk tespitleri sağlandı. Tespit edilen dokular fosfat tamponunda yıkanarak 2. tespit solüsyonuna alındılar.

Osmiyum Tetroksit tespiti:

Osmiyum tetroksit (OsO₄)..... 0.1 g

Distile su..... 5 cc

1 kısım Sorenson fosfat tamponu + 1 kısım osmiyum tetroksit

Dokular bu şekilde hazırlanmış %1'lik osmiyum tetroksit solüsyonuna 1 saat etkin bırakılarak tespitleri ve boyanmaları sağlanmış oldu.

Dehidratasyon ve blok oluşturulması:

Dokular osmiyumla ikinci kez tespit edildikten sonra, doku içindeki fazla suyun uzaklaştırılması için, artan derecelerdeki alkol serilerinden geçirildi.

% 50'lik alkol 10 dakika

% 60'lık alkol 10 dakika

% 70'lık alkol 10 dakika

Uranil asetat 30 dakika (1 g uranil asetat + 50 ml % 80'lik alkol karışımı hazırlandıktan sonra süzülerek 10 dakika bekletilip süzülerek uygulandı.)

% 80' lik alkol 2 kez yıkandı ve 10 dakika bekletildi.

% 90'lık alkol 10 dakika

% 96'lık alkol 10 dakika

% 100'lük alkol 15 dakika

Propilen oksit 30 dakika

Propilen oksit + 1. gömme materyali..... 30 dakika (gömme materyalinin doku içine geçişi sağlandı.)

1. Gömme materyali..... 1 gece 40 °C'de bekletildi.

1. Gömme materyali:

Araldit CY 212..... 10 cc

DDSA..... 10 cc

1. Gömme materyali..... 2 saat rotatorda oda ısısında

2. Gömme materyali..... 2 saat 40 °C'de bekletildiler.

2. Gömme materyali:

Araldit CY 212..... 10cc

DDSA..... 10cc

BDMA..... 0.4cc

Dibütil fitalat..... 1cc

Daha sonra dokular, içinde aynı gömme materyali bulunan 00 numara jelatin kapsüle gömüldü. Blok içindeki havanın çıkması için 1 saat oda ısısında bekletilen dokular, polimerizasyon için 24 saat 45°C’de, 48 saat 60°C’de etüvde bekletildi. Süre sonunda etüv kapatılarak dokular etüv içinde kendi hallerinde soğumaya bırakıldı.

Hazırlanan bloklardan LKB Leica ultramikrotom (Dechert Supernova) ile 1 µ kalınlığında kesitler alındı ve toluidin mavisi ile boyandı. Bilgisayar donanımlı foto-ışık mikroskobu (DCM 4000, Leica, Germany) ile incelenen kalın kesitlerin resimleri çekildi ve bu bölgeler işaretlenerek formvar kaplı bakır gridler üzerine 0.2-0.5 µ’luk ince kesitleri alındı. Kontrast sağlamak ereğiyle, alınan kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanarak Carl Zeiss EVO LS 10+ ED transmission elektron mikroskopta (TEM) değerlendirilerek fotoğraflandı.

3.5.İstatiksel Yöntem

Verilerin analizi Windows için SPSS 11.5 paket programında yapıldı. Seminifer tübül duvar kalınlığı dağılımının normale uygun olup olmadığı Shapiro Wilk testi ile araştırıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortanca (25-75) persentil olarak gösterildi.

Araştırma grupları arasında ve izlem zamanları arasında seminifer tübül duvar kalınlığı yönünden farkın önemliliği Bonferroni Düzeltmeli Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi. $p<0,017$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Kruskal Wallis test istatistiği sonucunun önemli bulunduğu durumlarda farka neden olan durumları tespit etmek amacıyla Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. $p < 0,0056$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. İmmünohistokimyasal Bulgular

Gelişimin 7. günü kontrol grubunda (Grup 1) testis kesitlerine ait PCNA boyamasında, tutulumun çekirdek düzeyinde olduğu izlendi (Resim 1A). Büyük büyültmeli resimde PCNA tutulumunun daha çok spermatogonyumlar ve oluşmakta olan primer spermatosit çekirdeklerinde olduğu dikkati çekti. Bazı Sertoli hücrelerinde belirgin bir tutulum izlenmezken, intersitisyel dokudaki Leydig hücre çekirdeklerinde de tutulumun varlığı dikkat çekiciydi (Resim 1B).

Gelişimin 7. günü hipoksi grubunda (Grup 2), testiste PCNA tutulumu seminifer tüpte kontrollere yakın görünüm sergilerken Leydig hücrelerinde tutulumun biraz daha arttığı ilgiyi çekiyordu (Resim 2A, 2B).

Gelişimin 7. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan grubun (Grup 3) testis dokusunda, tutulumun gelişimin 7. günü kontrol grubuna (Grup 1) ve gelişimin 7. günü hipoksi grubuna (Grup 2) karşın biraz daha az olduğu gözlemleniyordu (Resim 3A, 3B). Leydig hücrelerinde boyanma ise, gelişimin 7. günü kontrol grubuna (Grup 1) yakındı (Resim 3B).

Gelişimin 14. günü kontrol grubunda testis dokusunda (Grup 4) PCNA tutulumunun, Sertoli hücreleri dışında spermatogonyumlarda biraz daha orta dereceli ancak primer spermatositlerde oldukça yoğun olduğu dikkati çekiyordu (Resim 4A, 4B).

Leydig hücrelerinde tutulum da gelişimin 7.günü hipoksi grubuna (Grup 2) karşın biraz daha fazlaydı (Resim 4B).

Gelişimin 14. günü hipoksi grubunda (Grup 5) testis dokusunda seminifer tüpte ve Leydig hücrelerinde tutulumun, gelişimin 14. günü kontrol grubuna (Grup 4) karşın son derece az olduğu dikkati çekiyordu (Resim 5A, 5B). Ancak oluşan tek tük primer spermatositlerde tutulumun oldukça yoğun olduğu dikkati çekiyordu (Resim 5B).

Gelişimin 14. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan grubun (Grup 6) bulguları, gelişimin 14. günü kontrol grubuna (Grup 4) eşdeşti (Resim 6A, 6B).

Gelişimin 21. günü kontrol grubunda (Grup 7) testis kesitinde, PCNA tutulumu seminifer tüplerde birbirinden farklılıklar gösteriyordu. Bazı seminifer tüplerde spermatogonyumlarda ortadan zayıfa değişen, bazı seminifer tüplerin primer spermatositlerinde zayıf-orta-kuvvetli tutulum dikkati çekiyordu (Resim 7A, 7B). Bu gruba ait ender seminifer tüp lümenlerinin açıldığı dikkati çekti. Leydig hücre tutulumu bazı Leydig hücre çekirdeklerinde yoğun, bazılarında daha zayıf olduğu ayırt ediliyordu (Resim 7B).

Gelişimin 21. günü hipoksi grubunda (Grup 8), yine seminifer tüp hücrelerinde tutulumun daha çok primer spermatositlerde ve gelişen spermatosit 2'lerde olduğu dikkati çekiyordu (Resim 8A, 8B). Leydig hücrelerinde ise tutulum oldukça zayıftı (Resim 8B).

Gelişimin 21. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan grupta (Grup 9), seminifer tüp hücre gelişiminin diğer gruplara karşın daha uyarılmış olduğu gözlemlendi (Resim 9A, 9B). Primer spermatosit ve spermatosit 2'lerde tutulum varlığı dikkat çekiciydi (Resim 9B).

Gelişimin 7. günü kontrol grubunda (Grup 1) testis dokusunda, TUNEL yöntemiyle seminifer tüplerde Leydig hücrelerinde belirgin bir apoptozis gözlemlenmedi (Resim 10).

Gelişimin 7. günü hipoksi grubunda (Grup 2) testis dokusunda, bazı seminifer tüp hücrelerinde apoptozis dikkati çekiyordu. Leydig hücrelerinde belirgin bir tutulum görülmedi (Resim 11).

Gelişimin 7. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan grupta (Grup 3), seminifer tüp epitel hücrelerinden spermatogonyumlarda ve intersitisyel alanlardaki Leydig hücrelerinde apoptozis görülmedi (Resim 12).

Gelişimin 14. günü kontrol grubunda (Grup 4) testis dokusunda, epitelin gelişmesine koşut olarak TUNEL yöntemiyle seminifer tüp hücrelerinin bazılarının apoptozise gittiği belirgin olarak ayırt ediliyordu. Ancak Leydig hücre gruplarında herhangi bir boyanma dikkati çekmiyordu (Resim 13).

Gelişimin 14. günü hipoksi grubunda (Grup 5) testis dokusunda, seminifer tüp epitelinde özellikle spermatosit 1 yerleşimli boyanma ilgiyi çekiyordu (Resim 14 A,14B).

Gelişimin 14. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan grupta (Grup 6), testis dokusunda yine bazı tip hücrelerdeki apoptozis izleniyordu (Resim 15).

Gelişimin 21. günü kontrol grubunda testis kesitinde (Grup 7), seminifer tüplerde apoptozisin son derece az olduğu izlenirken (Resim 16); gelişimin 21. günü hipoksi grubunda (Grup 8) apoptozisin yaygınlığı dikkati çekti (Resim 17). Ancak gelişimin 21. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan grupta (Grup 9) görünümün, gelişimin 21. günü kontrol grubuna (Grup 7) yaklaştığı ilgiyi çekti (Resim 18).

4.2. Yarı-İnce Kesit Bulguları

Gelişimin 7. günü kontrol grubunda testis dokusu yarı ince kesitinde (Grup 1), seminifer tüp hücrelerinde ağırlıklı olarak Sertoli hücrelerinin dağılımı bunun yanı sıra spermatogonyumlar dikkati çekti. Bunun yanı sıra tüp lümenleri kapalıydı. Epitel bazal laminası ve myoid hücreler normaldi. İntersitisyel alanda gelişkin damarlar ve damarlara yakın yerleşimli inaktif Leydig hücreleri gözlemleniyordu (Resim 19).

Gelişimin 7. günü hipoksi grubunda (Grup 2) testis dokusu yarı ince kesit değerlendirmesinde, seminifer tüplerde yaygın

vakuolizasyon ilgiyi çekiyordu. Tüp lümenleri kapalıydı ve intersitisyel alanlarda inaktif Leydig hücreleri belirgindi (Resim 20).

Gelişimin 7. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan grubun (Grup 3) testis dokusunda, seminifer tüplerdeki vakuoler yapının daha az olduğu belirlendi (Resim 21A, 21B).

Gelişimin 14. günü kontrol grubunda (Grup 4) testis dokusu yarı ince kesit resimlerinde, seminifer tüp lümenlerinin hala kapalı olduğu, Sertoli hücrelerinin gelişkin yapıda olduğu ve seminifer epiteldeki farklanma dikkat çekiciydi. Primer spermatositler gelişkindi (Resim 22A). Leydig hücrelerinin daha aktifleştiği ilgiyi çekiyordu (Resim 22B).

Gelişimin 14. günü hipoksi grubunda (Grup 5) testis dokusu yarı ince kesitinde yapının, 7. gün kontrol grubuna (Grup1) benzediği ancak epitelin biraz daha kalınlaştığı dikkati çekiyordu. Primer spermatositlerin gelişkin olduğu ancak tüp lümenlerinin hala kapalı olduğu gözlemlendi. İntersitisyel alanda kan damarları çoktu ve Leydig hücreleri erişkin yapı sergiliyordu (Resim 23A, 23B).

Gelişimin 14. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan grubun (Grup 6) testis dokusunda seminifer tüp epitelinin, gelişimin 14. günü hipoksi grubuna (Grup 5) karşın daha gelişkin olduğu ve gelişimin 14. günü kontrol grubu (Grup 4) yapısı sergilediği ilgiyi çekiyordu (Resim 24A,24B). İntersitisyel alanda damarlanmanın da daha normal olduğu izleniyordu (Resim 24A). Leydig hücreleri normal yapıdaydı (Resim 24B).

Gelişimin 21. günü kontrol grubunda (Grup 6) testis dokusu yarı ince kesit değerlendirmesinde, bazı seminifer tüp lümenlerinin açık olduğu izlendi. Epitelde hücre gelişim evreleri ayırt ediliyordu (Resim 25A). Yer yer spermatosit 2'lerin olduğu ayırt edildi. İntersitisyel alanda damarlanma ve Leydig hücreleri normal yapıdaydı (Resim 25B).

Gelişimin 21. günü hipoksi grubunda (Grup 8) testis dokusu yarı ince kesit resimlerinde, seminifer tüp hücrelerinde ve Leydig hücrelerinde yer yer vakuolizasyonun varlığı ilgi çekiyordu (Resim 26).

Gelişimin 21. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan grubun (Grup 9) testis dokusunda, seminifer tüp ve Leydig hücrelerinde vakuolizasyonu kısmen geri döndürdüğü izleniyordu (Resim 27A, 27B). Seminifer epitelde gelişim evreleri kontrole eşdeğerdi (Resim 27B).

4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular

Gelişimin 7. günü kontrol grubu (Grup 1) testis dokusu elektron mikroskop resimlerinde, seminifer tüp epitelinin ve seminifer tüp hücrelerinin normal yapıda olduğu gözlemlendi. Tüp epitelinde ağırlıklı olarak bazal bölümde Sertoli hücrelerinin yaygınlığı ve bunun yanı sıra az sayıda spermatogonyumların varlığı dikkat çekiciydi. Çeşitli mitoz evrelerindeki primer spermatositlerin yanı sıra olgunlaşmakta olan spermatosit 1 varlığı ayırt ediliyordu. Seminifer tüp bazal lamina ve myoid hücre katmanı normal olarak izleniyordu (Resim 28A). İntersitisyel alanda Leydig hücrelerinde çekirdek yapısı ovalimsi yuvarlak şekliyle dikkati

ekerken kromatin dağılımının çekirdek zarı altında yoğunlaştığı belirgindi. Leydig hücrelerinin sitoplazmasında ftal mitokondriyon görünümü ve tek tük lipid varlığı ilgiliyi çekiyordu (Resim 28B).

Gelişimin 7. günü hipoksi grubunda (Grup 2) testis ince kesitinde, seminifer epitelde Sertoli hücrelerinin ağırlıkta olduğu görüldü, arada spermatogonyumlar ilgiliyi çekti. Sertoli hücrelerinde ve spermatogonyumlarda sitoplazmada mitokondriyonlarda yaygın kristolizisi simgeleyen vakuoler görünüm ilgiliyi çekiyordu. Çekirdek zarında yer yer açılmalar, Sertoli hücrelerinde kristolizise uğramış mitokondriyonlarda miyelin yapıların biçimlendiği gözlemleniyordu (Resim 29A). Leydig hücrelerinde mitokondriyonlarda aynı değişimler gözlenirken sitoplazmada vakuolize mitokondriyonlarda kristolizis izleniyor, sitoplazmada lipid damlacıkları ve yoğun cisimler dikkati çekiyordu. Sitoplazmada granülsüz endoplazmik retikulum sisternaları yer yer yoğun bir madde ile dolu olarak dikkati çekiyordu. Bunun yanında bazı mitokondriyonların oldukça yoğun matriksli olduğu ayırt ediliyordu (Resim 29B).

Gelişimin 7. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan deney grubu testis dokusunda (Grup 3), seminifer epitelde genelde Sertoli hücrelerinin çoğunlukta olduğu, spermatogonyumların az sayıda olduğu izlenirken diğer aşamadaki hücrelerin gözlenmediği ayırt edildi. Seminifer tüplerde bazal laminanın, gelişimin 7. günü kontrol grubuna (Grup 1) göre biraz kalınlaştığı; myoid hücre katmanının normal yapıda olduğu gözlendi (Resim 30A). Kan damarlarına yakın yerleşimli Leydig hücreleri ayırt edildi. Aynı gruba ait büyük büyütmeli resimde Leydig hücrelerinde yağ damlacıklarının, gelişimin 7. günü kontrol grubuna (Grup 1) karşın biraz daha fazla olduğu, mitokondriyonlarda kristolizisin varlığı dikkat çekiciydi (Resim 30B).

Gelişimin 14. günü kontrol grubunda (Grup 4) testis dokusunda seminifer epitelde; Sertoli hücreleri, spermatogonyumlar ve spermatozoidler izlendi. Seminifer tüp bazal laminası ve myoid hücreler normal yapıdaydı (Resim 31A). İntersitisyel alanda Leydig hücrelerinin, gelişimin 7. günü kontrol grubuna (Grup 1) karşın daha gelişkin olduğu ayırt ediliyordu. Sitoplazmada granülsüz endoplazmik retikulum sisternaları yer yer yoğun bir madde ile dolu olarak dikkati çekiyordu. Mitokondriyonlarda yer yer kristolizis ilgiyi çekiyordu. Bazı lipid damlacıkları normal yapıdayken bir grubunda da yoğun bir öz bölgesi izleniyordu (Resim 31B).

Gelişimin 14. günü hipoksi grubunda (Grup 5), seminifer tüp epitelinin, gelişimin 7. günü hipoksi grubuna (Grup 2) karşın daha gelişkin olduğu, yer yer spermatozoidlerin varlığı ayırt edildi. Bazal lamina ve myoid hücreler normal yapıdaydı (Resim 32A). Leydig hücrelerinde çekirdekte heterokromatin dağılımının daha yoğun olduğu belirlendi. Mitokondriyonlar genelde tübüler kristalıydı. Granülsüz endoplazmik retikulum tubulusları yine yer yer az yoğun bir madde ile dolu olarak gözleniyordu. Lipid damlacıkları bazı bölgelerde birbirleriyle birleşmiş gibi yan yana gelmişlerdi. Yer yer vakuolize yapılara dönüştükleri dikkati çekiyordu (Resim 32B).

Gelişimin 14. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan grubun testis dokusunda (Grup 6) seminifer epitelin, gelişimin 7. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan gruba karşın daha düzenli olduğu belirgin olarak ayırt ediliyordu. Sertoli hücreleri, spermatogonyum, spermatozoid 1 ve spermatozoid 2'ler gelişmişti. Seminifer tüp bazal laminası ve myoid hücreler normal yapıdaydı (Resim 33A). Leydig hücrelerinde yapının, gelişimin 14. günü hipoksi grubuna (Grup 5) karşın biraz daha

korunduğu, yoğun matriksli mitokondriyonların, granülsüz endoplazmik retikulum tubuluslarının belirginliği, irili ufaklı lipid damlacıklarının varlığının yanı sıra vakuoler yapıların azaldığı belirlendi (Resim 33B).

Gelişimin 21. günü kontrol grubunda (Grup 7) testis ince kesitlerinde, seminifer tübüllerin erişkin yapısını kazanmaya başladığı yapısal olarak gözlemleniyordu. Sertoli hücreleri, spermatogonyum, spermatosit 1 ve spermatosit 2 toplulukları ilgi çekiciydi. Lümene yakın bölümde yuvarlak spermatidler gözleniyordu. Çekirdeğin bir kutbunda akrozomal vezikülün oluştuğu gözlemlendi. Bazal lamina ve myoid hücreler normal yapıdaydı (Resim 34A). İntersitisyel dokuda, Leydig hücrelerinin gelişkin olduğu granülsüz endoplazmik retikulum tubuluslarında yoğun madde birikimi ilgiyi çekiyordu. Lipid damlacıklarında da yer yer yoğun maddenin granülün öz bölgesinde biriktiği gözlemlendi. Mitokondriyonlar irili ufaklıydı (Resim 34B).

Gelişimin 21. günü hipoksi grubunda (Grup 8), seminifer tüp epitel hücrelerinde dejenerasyonu simgeleyen görüntü dikkati çekerken bazal lamina ve myoid hücre katmanı oldukça normal yapıdaydı (Resim 35A). Leydig hücrelerinde de lipid granüllerinde granül içeriğinin yoğunlaşıp bir öz bölge oluşturduğu ve yaygınlaştığı dikkat çekiciydi. Granülsüz endoplazmik retikulum tubuluslarının yer yer genişlediği ayırt edilirken, bazı mitokondriyonlarda kristolizis gözleniyordu (Resim 35B).

Gelişimin 21.günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan grupta (Grup 9) seminifer tüp epitelinin, gelişimin 21. günü hipoksi grubuna (Grup 8) karşın gelişimin 21. günü kontrol grubunda (Grup 7) benzerliği ayırt edildi (Resim 36A). Leydig hücrelerinde de granülsüz endoplazmik

retikulum tubuluslarında genişlemelerin hala olduğu buna karşın mitokondriyonların korunduğu belgindi (Resim 36B).

4.4.İstatistiksel Bulgular

7. gün içerisinde gruplar arasında seminifer tübül duvar kalınlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü ($p<0,001$). Söz konusu farka neden olan durumlar sorgulandığında, gelişimin 7. günü kontrol grubuna göre gelişimin 7. günü hipoksi grubu ve gelişimin 7. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan grubun seminifer tübül duvar kalınlığı daha az bulundu ($p=0,002$ ve $p=0,002$). Gelişimin 7. günü hipoksi grubu ile gelişimin 7. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan grup arasında seminifer tübül duvar kalınlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,009$; Bonferroni Düzeltmesi'ne göre $p>0,0056$ olduğu için gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır) (Tablo1, Grafik1).

14. gün içerisinde gruplar arasında seminifer tübül duvar kalınlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü ($p=0,003$). Söz konusu farka neden olan durumlar sorgulandığında, gelişimin 14. günü kontrol grubuna göre, gelişimin 14. günü hipoksi grubu ve gelişimin 14. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan grubunun seminifer tübül duvar kalınlığı daha az bulundu ($p=0,002$ ve $p=0,002$). Gelişimin 14. günü hipoksi grubu ile gelişimin 14. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan grup arasında seminifer tübül duvar kalınlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,699$) (Tablo2, Grafik1).

21. gün içerisinde gruplar arasında seminifer tübül duvar kalınlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü ($p<0,001$). Söz konusu farka neden olan durumlar sorgulandığında, gelişimin 21. günü kontrol grubuna karşın gelişimin 21. günü hipoksi grubunun seminifer tübül duvar kalınlığı daha az bulundu ($p=0,002$). Gelişimin 21. günü kontrol grubu ile gelişimin 21. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan grup arasında seminifer tübül duvar kalınlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,015$; Bonferroni Düzeltmesi'ne göre $p>0,0056$ olduğu için gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır). Gelişimin 21. günü hipoksi grubuna göre, gelişimin 21. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan grubun seminifer tübül duvar kalınlığı istatistiksel anlamlı olarak daha fazlaydı ($p=0,002$) (Tablo3,Grafik1).

Kontrol grubu içerisinde 7, 14 ve 21. gün seminifer tübül duvar kalınlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü ($p<0,001$). 7. güne göre sırasıyla; 14 ve 21. gündeki seminifer tübül duvar kalınlığı daha fazla bulundu ($p=0,002$ ve $p=0,002$). Ayrıca, 14. güne göre 21. gündeki seminifer tübül duvar kalınlığı daha fazla bulundu ($p=0,002$) (Grafik1).

Hipoksi grubu içerisinde 7, 14 ve 21. gün seminifer tübül duvar kalınlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü ($p<0,001$). 7. güne göre sırasıyla; 14 ve 21. gündeki seminifer tübül duvar kalınlığı daha fazla bulundu ($p=0,002$ ve $p=0,002$). Ayrıca, 14. güne göre 21. gündeki seminifer tübül duvar kalınlığı daha fazla bulundu ($p=0,002$) (Grafik1).

Hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan grup içerisinde 7, 14 ve 21. gün seminifer tübül duvar kalınlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü ($p<0,001$). 7. güne göre sırasıyla; 14 ve 21. günde seminifer tübül duvar kalınlığı daha fazla bulundu ($p=0,002$ ve $p=0,002$). Ayrıca, 14. güne göre 21. günde seminifer tübül duvar kalınlığı daha fazla bulundu ($p=0,002$) (Grafik1).

Tablo 1: 7. Gün gruplarına ait seminifer tübül duvar kalınlığı ölçümlerine ilişkin tanımlayıcı istatistikler ve yüzdelik değerleri.

		Tanımlayıcılar					
		İstatistik					
GRUPLAR		Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	Çeyrekler Arası Genişlik	Minimum	Maksimum
Seminifer Tübül Duvar Kalınlığı	Kontrol	47,3872	1,21016	47,5658	1,9229	45,42	48,46
	Hipoksi	34,5478	2,71857	35,5650	5,0633	30,28	37,12
	Hipoksi+Ginkgo	37,6119	,73656	37,3733	1,0687	37,06	38,97

a. GÜNLER = 7,00

			Yüzdelikler		
GRUPLAR			25	50	75
Tukey's Hinges	Seminifer Tübül Duvar Kalınlığı	Kontrol	46,8783	47,5658	48,4300
		Hipoksi	32,1417	35,5650	36,6133
		Hipoksi+Ginkgo	37,0567	37,3733	37,8450

a. GÜNLER = 7,00

Tablo 2: 14. Gün gruplarına ait seminifer tübül duvar kalınlığı ölçümlerine ilişkin tanımlayıcı istatistikler ve yüzdelik değerleri.

Tanımlayıcılar

GRUPLAR		İstatistik					
		Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	Çeyrekler Arası Genişlik	Minimum	Maksimum
Seminifer Tübül Duvar Kalınlığı	Kontrol	74,7269	2,98221	74,3883	3,6063	70,48	79,69
	Hipoksi	59,1344	2,90519	59,0300	4,5550	55,07	63,61
	Hipoksi+Ginkgo	60,0894	5,54388	60,3542	9,8696	52,22	67,64

a. GÜNLER = 14,00

Yüzdelikler

GRUPLAR			Yüzdelikler		
			25	50	75
Tukey's Hinges	Seminifer Tübül Duvar Kalınlığı	Kontrol	73,8383	74,3883	75,5750
		Hipoksi	57,4183	59,0300	60,6467
		Hipoksi+Ginkgo	55,9783	60,3542	63,9967

a. GÜNLER = 14,00

Tablo 3: 21. Gün gruplarına ait seminifer tübül duvar kalınlığı ölçümlerine ilişkin tanımlayıcı istatistikler ve yüzdelik değerleri.

Tanımlayıcılar

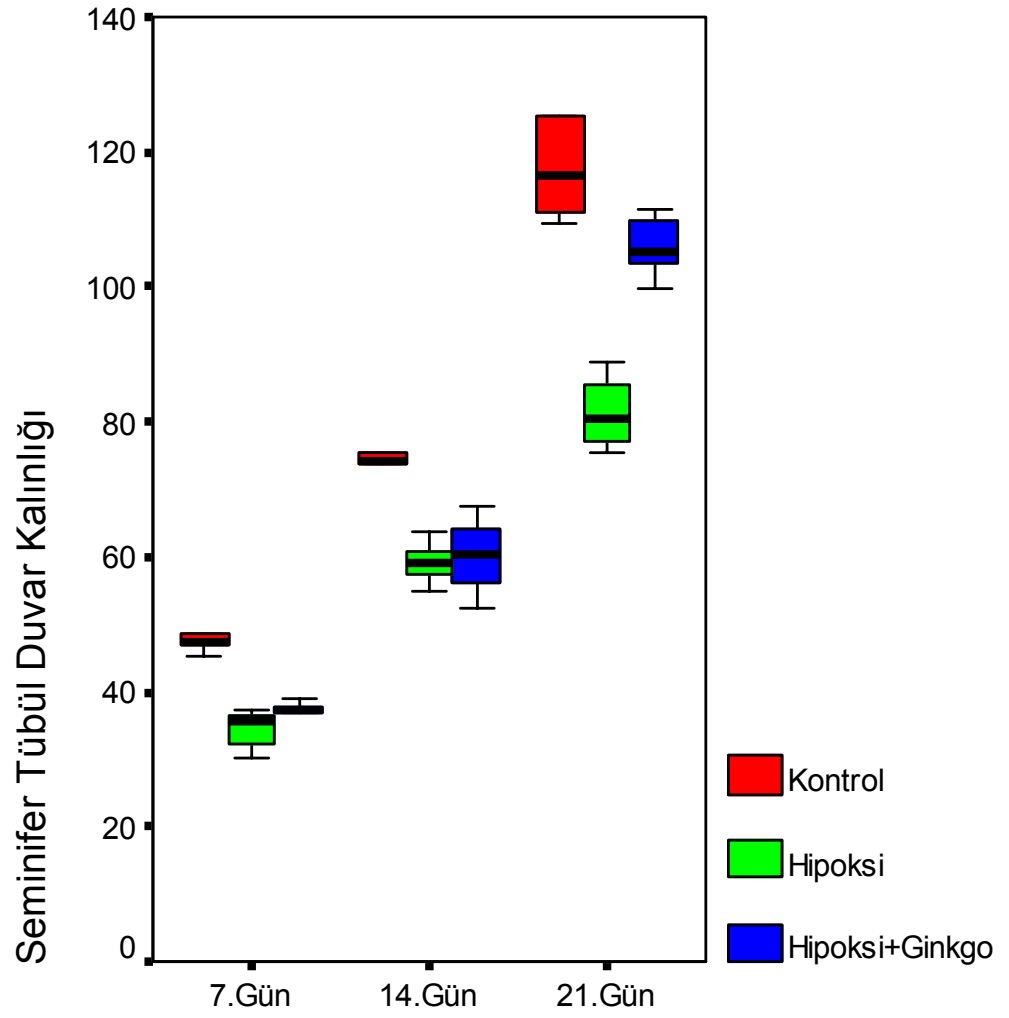
GRUPLAR		İstatistik					
		Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	Çeyrekler Arası Genişlik	Minimum	Maksimum
Seminifer Tübül Duvar Kalınlığı	Kontrol	121,4869	14,91545	116,7250	20,6188	109,59	149,26
	Hipoksi	81,3339	5,13325	80,6573	9,6147	75,48	88,82
	Hipoksi+Ginkgo	105,8369	4,27534	105,3925	7,6925	99,60	111,39

a. GÜNLER = 21,00

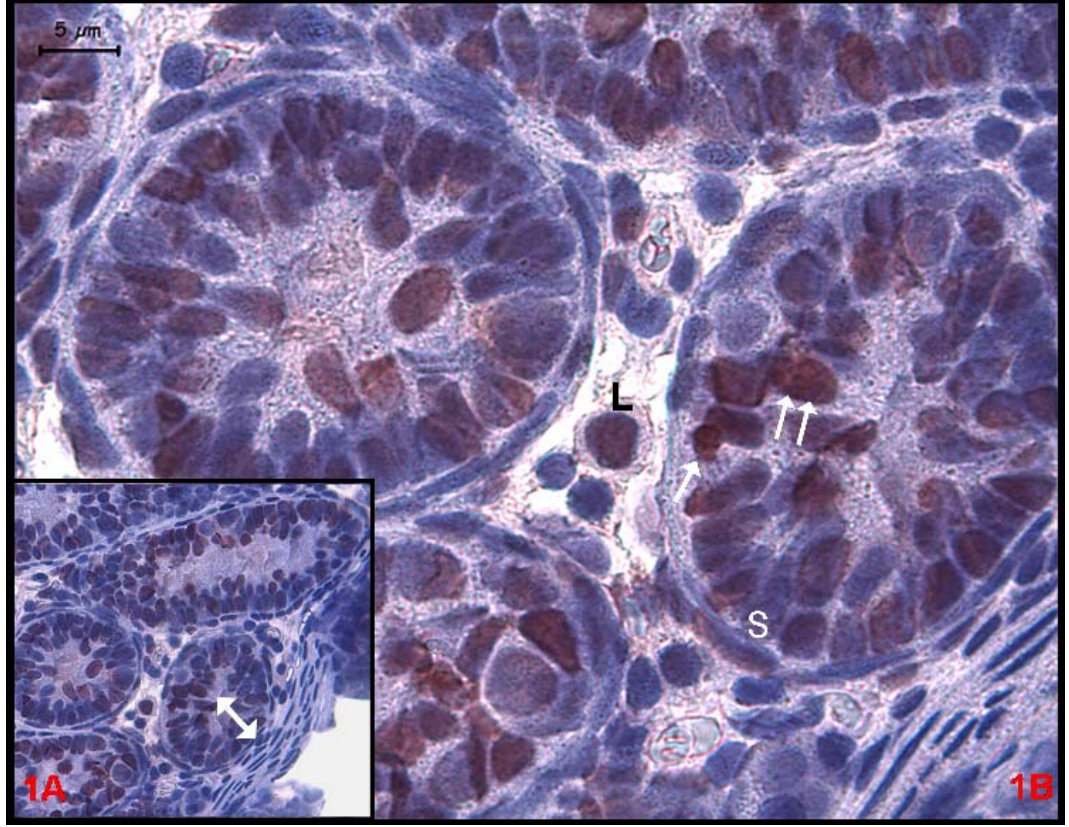
Yüzdelikler

GRUPLAR			Yüzdelikler		
			25	50	75
Tukey's Hinges	Seminifer Tübül Duvar Kalınlığı	Kontrol	111,1750	116,7250	125,4417
		Hipoksi	77,0067	80,6573	85,3783
		Hipoksi+Ginkgo	103,4600	105,3925	109,7883

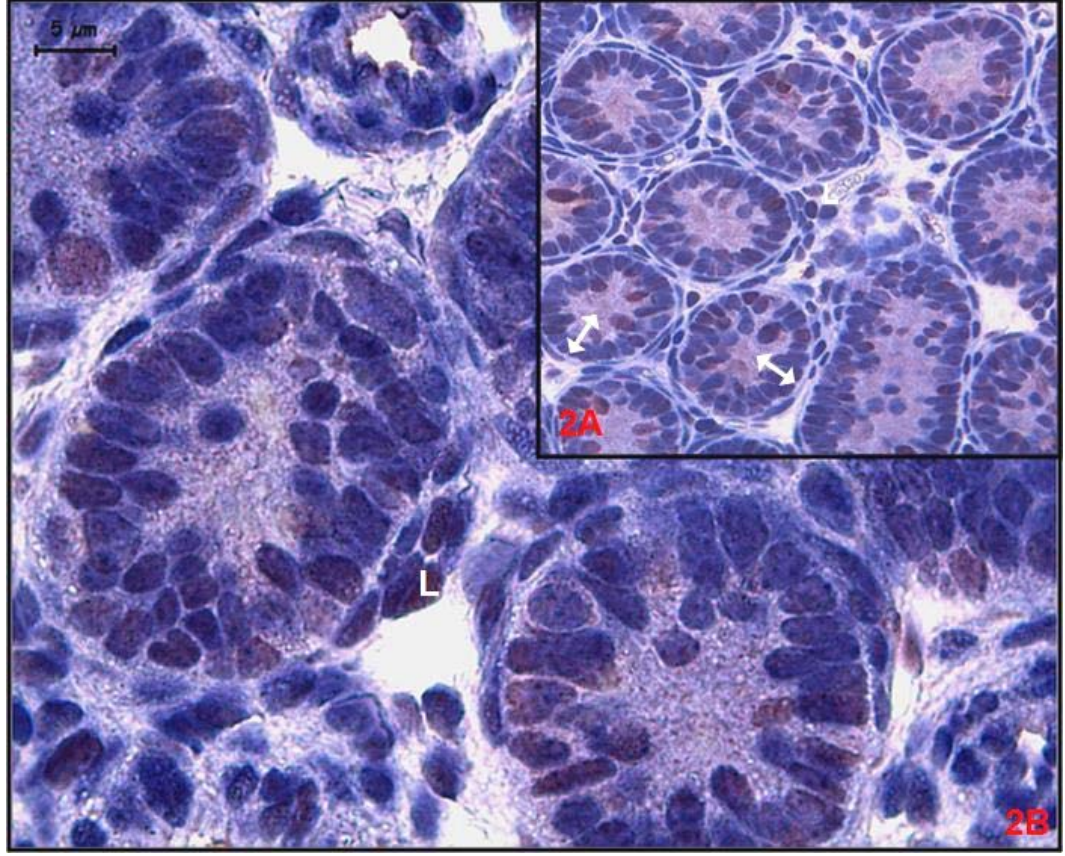
a. GÜNLER = 21,00



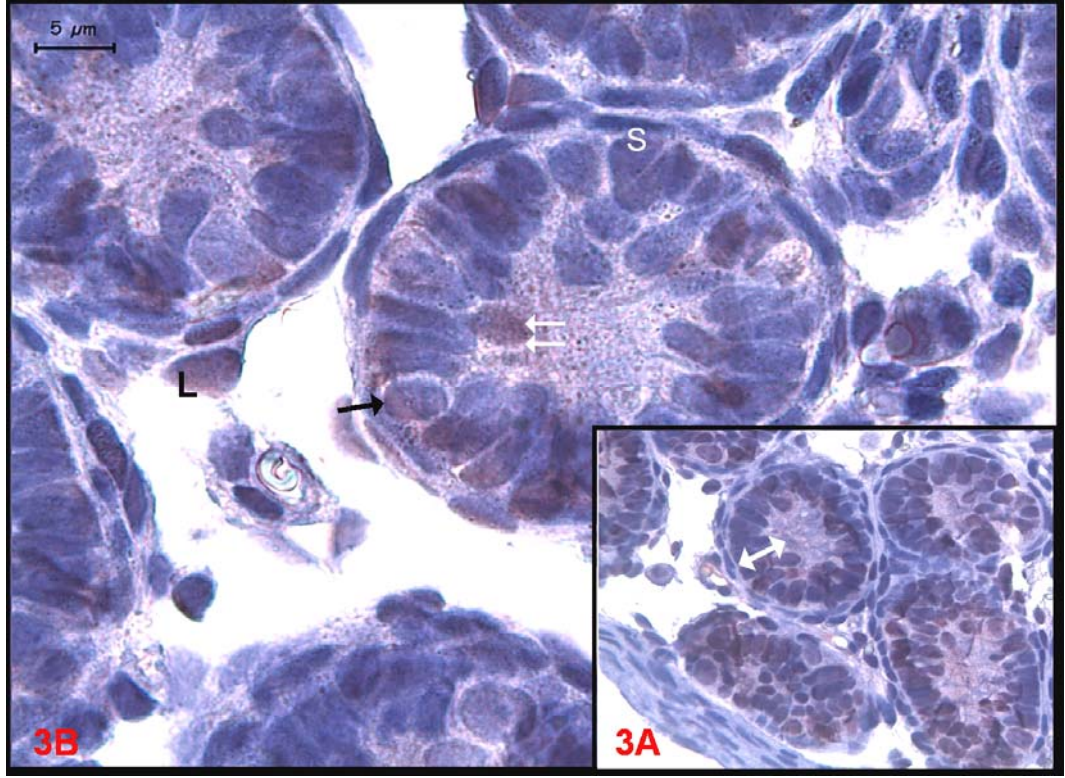
Grafik 1: Gruplara ve İzlem Zamanlarına Göre Seminifer Tübül Duvar Kalınlığı Düzeyleri



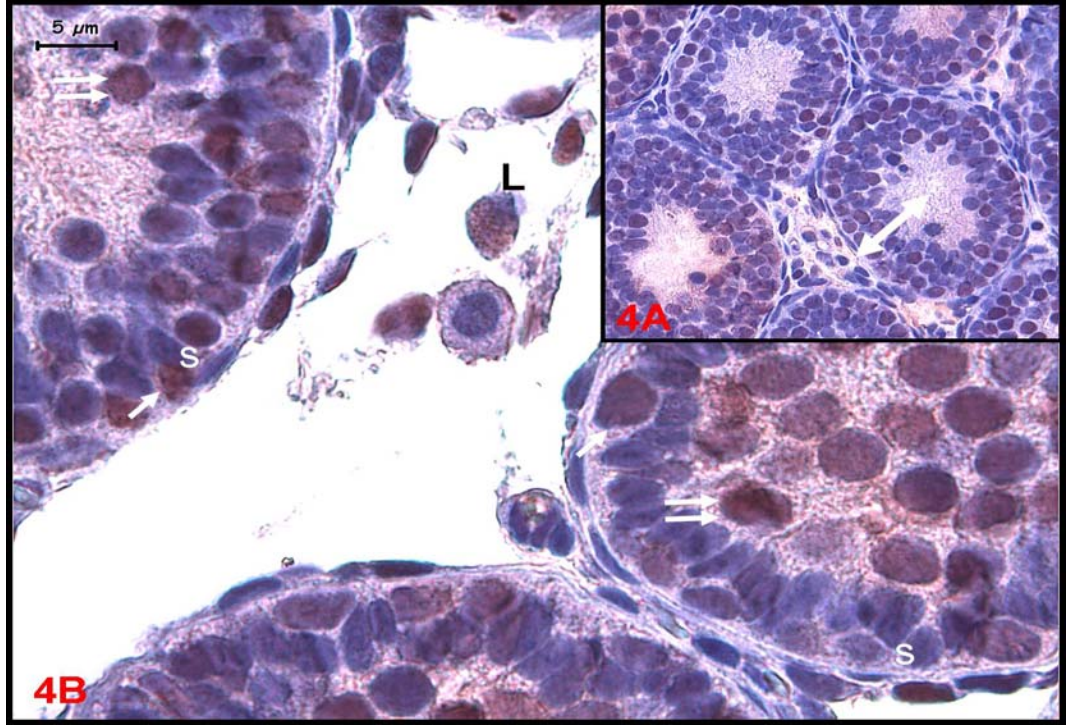
Resim 1: (Grup 1) Gelişimin 7. günü kontrol grubu testis dokusu PCNA boyamasında küçük büyütmeli resimde seminifer tübül epitelinde (→) tutulum görülüyor (1Ax400). Büyük büyültmede görülen PCNA immün boyamasında; tutulumun spermatogonyum (→) primer spermatositler (⇌) ve Leydig hücreleri (L) çekirdeklerindeki yoğunluğu izlenirken, bazı Sertoli hücrelerinde (S) PCNA immünreaktivitesi görülüyor (1Bx1000) (İmmünperoksidaz&Hematoksilen).



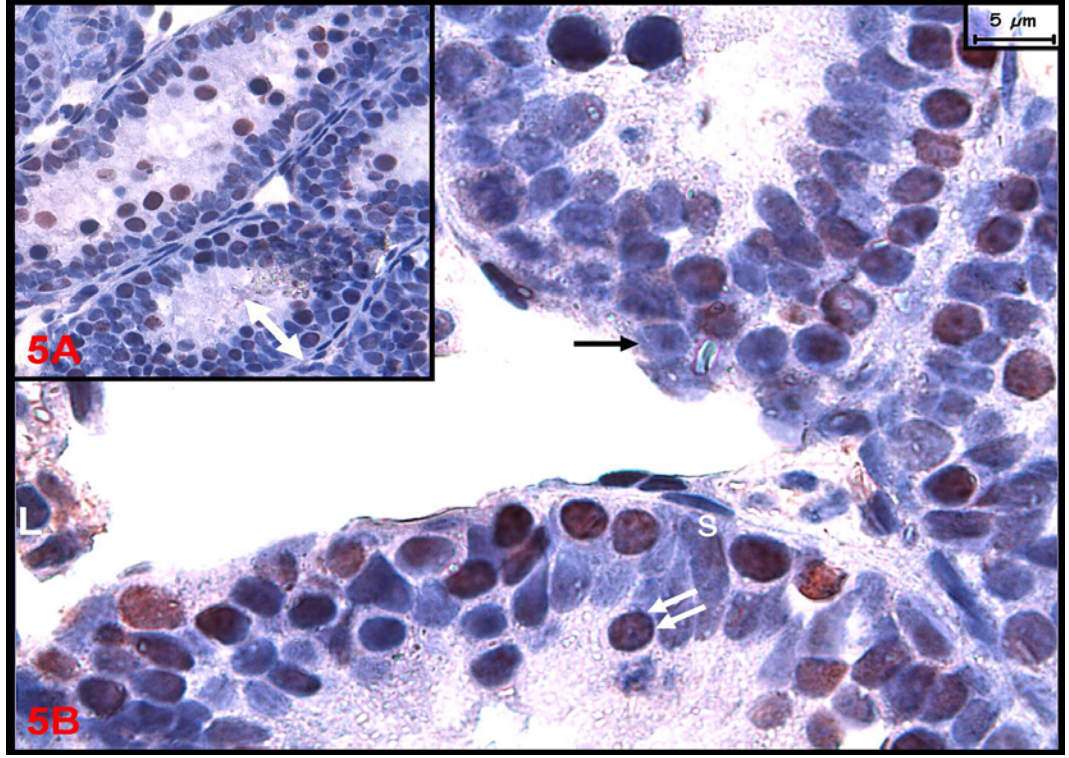
Resim 2: (Grup 2) Gelişimin 7. günü hipoksi grubunda, testis dokusuna ait küçük büyültmeli resimde PCNA boyamasında seminifer tüp epitelinde (↔) (2Ax400) ve Leydig hücrelerinde (L) tutulum görülüyor (2Bx 1000) (İmmünperoksidaz&Hematoksilen).



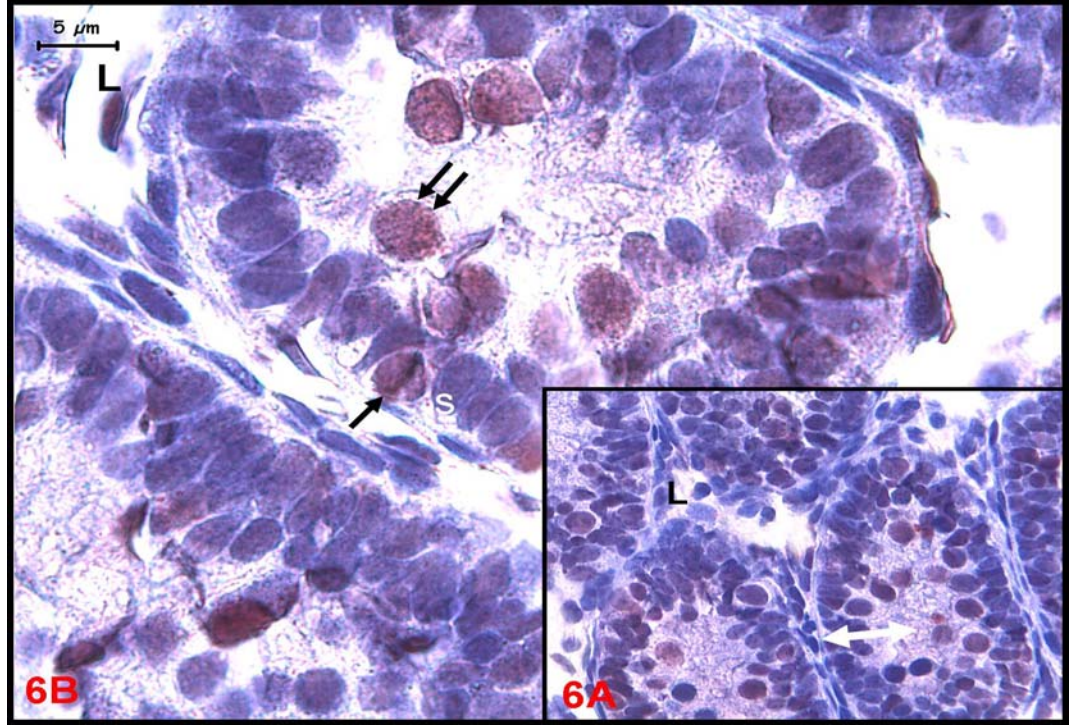
Resim 3: (Grup 3) Gelişimin 7. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan deney grubundan alınan testis dokusunda; PCNA primer antikoru ile yapılan boyamada, küçük büyültmeli resimde seminifer tüp epitelinde (↔) tutulum görülürken (3Ax400), büyük büyültmede PCNA immünreaktivitesi görülen spermatogonyum (→), primer spermatosit (⇔) ve Leydig hücreleri (L) izleniyor (3Bx1000) (İmmünperoksidaz&Hematoksilen).



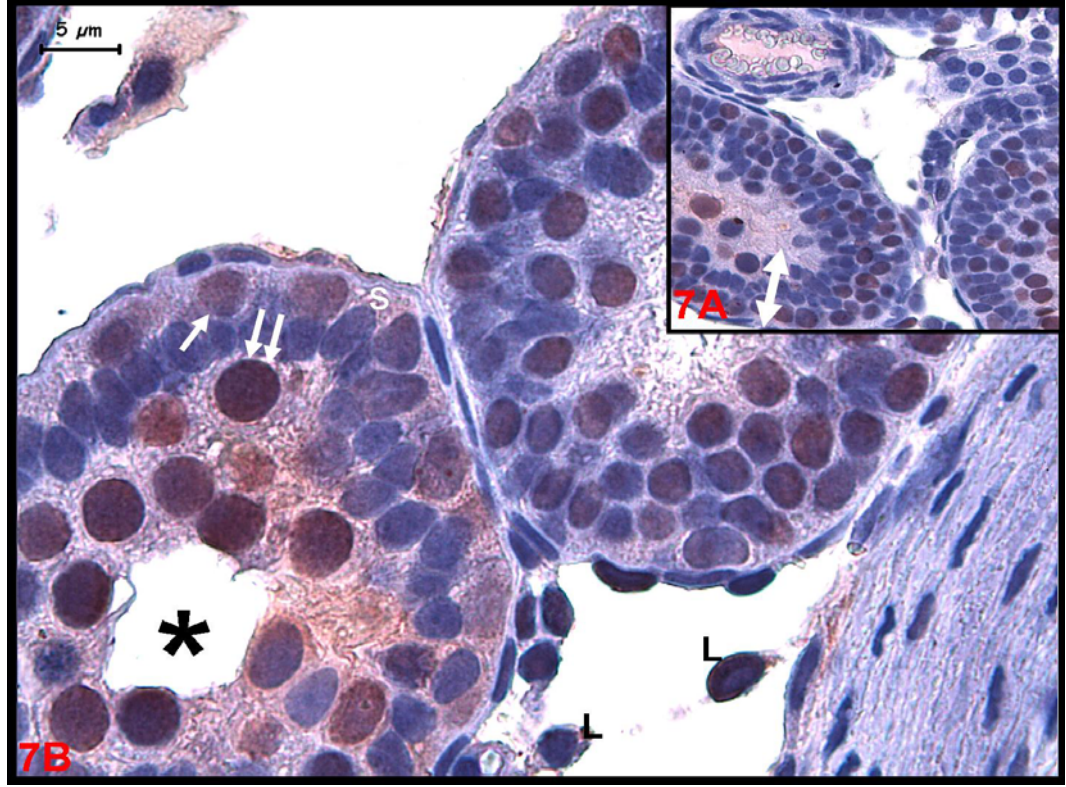
Resim 4: (Grup 4) Gelişimin 14. günü kontrol grubundan alınan testis doku örneklerinde PCNA boyamasında küçük büyültmeli resimde seminifer tüp epitelindeki (↔) tutulum görülüyor. (4Ax400) Büyük büyültmede PCNA negatif Sertoli hücreleri (S) ile pozitif boyanan spermatogonyumlar (→), primer spermatositler (⇨) ve bazı Leydig hücreleri (L) ayırt ediliyor (4Bx1000) (İmmünperoksidaz&Hematoksilen).



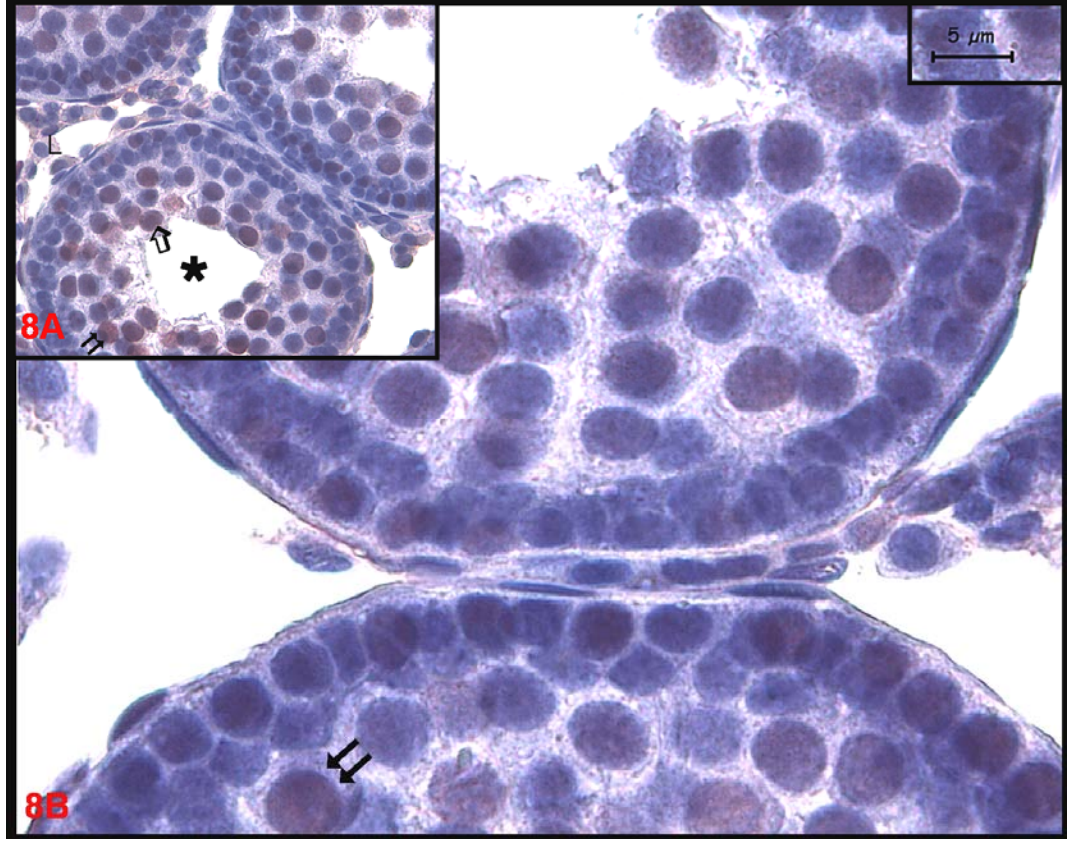
Resim 5: (Grup 5) Gelişimin 14. günü hipoksi grubundan alınan testis dokusuna ait küçük büyültmeli incelemelerde PCNA immün boyamasında seminifer tüp epitelindeki (↔) tutulum ayırt ediliyor (5Ax400). Büyük büyültmeli resimde immünnegatif Sertoli hücreleri (S) ve spermatogonyumlarla (→) birlikte PCNA pozitif tutulum gösteren az sayıdaki Leydig hücreleri (L) ile primer spermatositler (⇔) gözleniyor (5B x1000) (İmmünperoksidaz&Hematoksilen).



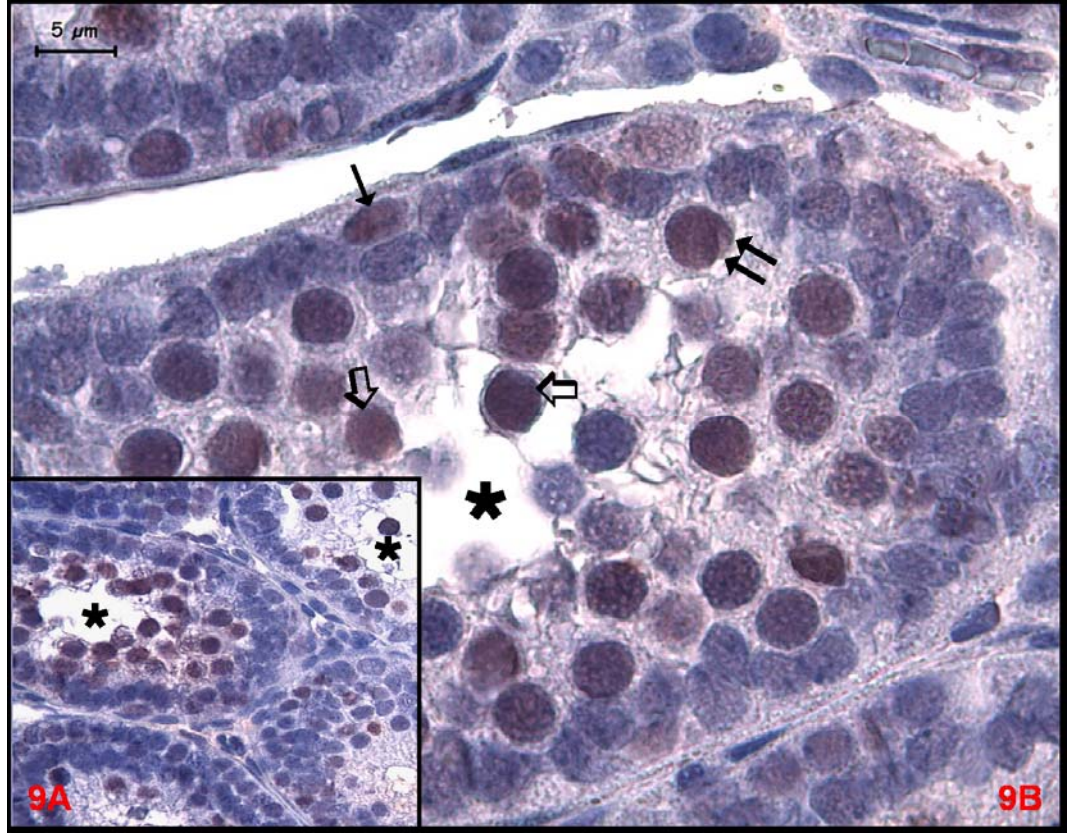
Resim 6: (Grup 6) Gelişimin 14. günü hipoksi+ Ginkgo biloba uygulaması yapılan deney grubundan alınan testis dokusunun PCNA primer antikoru ile yapılan değerlendirilmesinde küçük büyültmeli resimde; seminifer tüp epitelinde (→) ve Leydig hücrelerinde (L) tutulum görülüyor. (6Ax400) Büyük büyültmeli resimde immünnegatif tutulum gösteren Sertoli hücreleri (S), orta derecede tutulum gösteren spermatogonyumlar (→), daha kuvvetli tutulum gösteren primer spermatositler (⇨) ve immünpozitif Leydig hücreleri (L) dikkati çekiyor (6Bx1000) (İmmünperoksidaz&Hematoksilen).



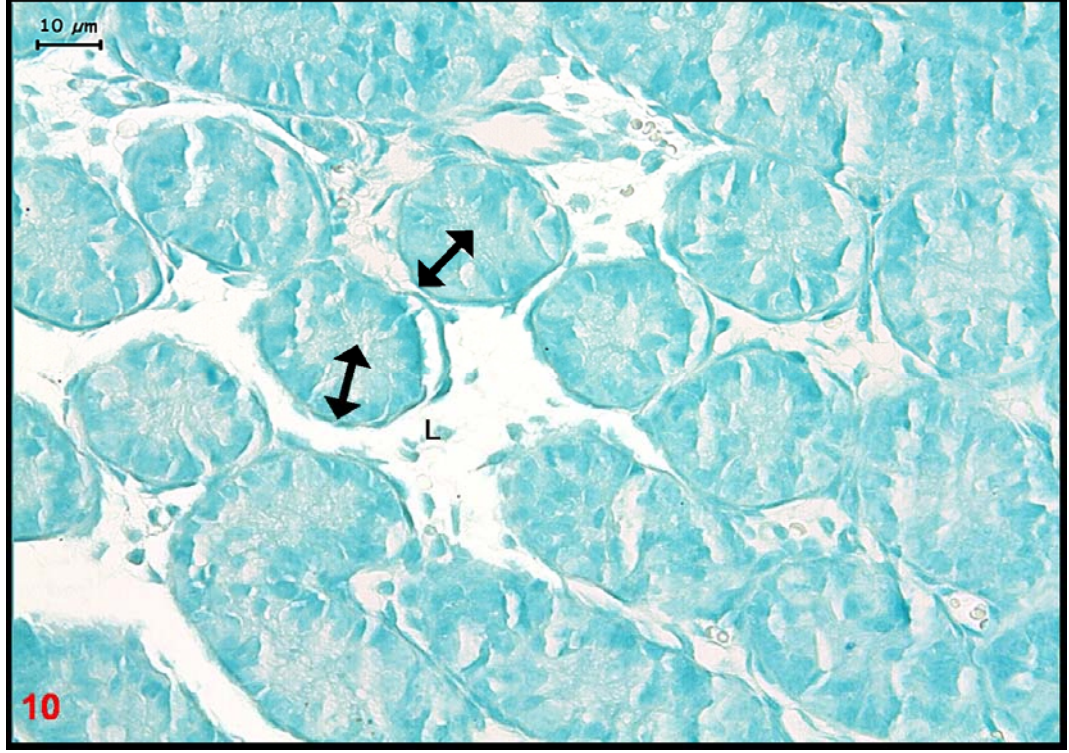
Resim 7: (Grup 7) Gelişimin 21. günü kontrol grubunda testis dokusuna ait PCNA boyamasında; PCNA tutulumu küçük büyütmeli resimde seminifer tüp epitelinde spermatogenik seriyi oluşturan farklı hücrelerde (↔) ayırt ediliyor (7Ax400). Büyük büyütmeli resimlerde bazı seminifer tüp lümenlerinin (*) açık olduğu görülüyor. Spermatogonyumlarda (→) ve primer spermatositlerde (⇔) PCNA pozitif tutulum izlenirken, Sertoli hücrelerinin (S) ise PCNA negatif oldukları ayırt ediliyor. İntersitisyel dokudaki bazı Leydig hücrelerinde (L) zayıf, bazılarında ise kuvvetli tutulum dikkati çekiyor (7Bx1000) (İmmünperoksidaz&Hematoksilen).



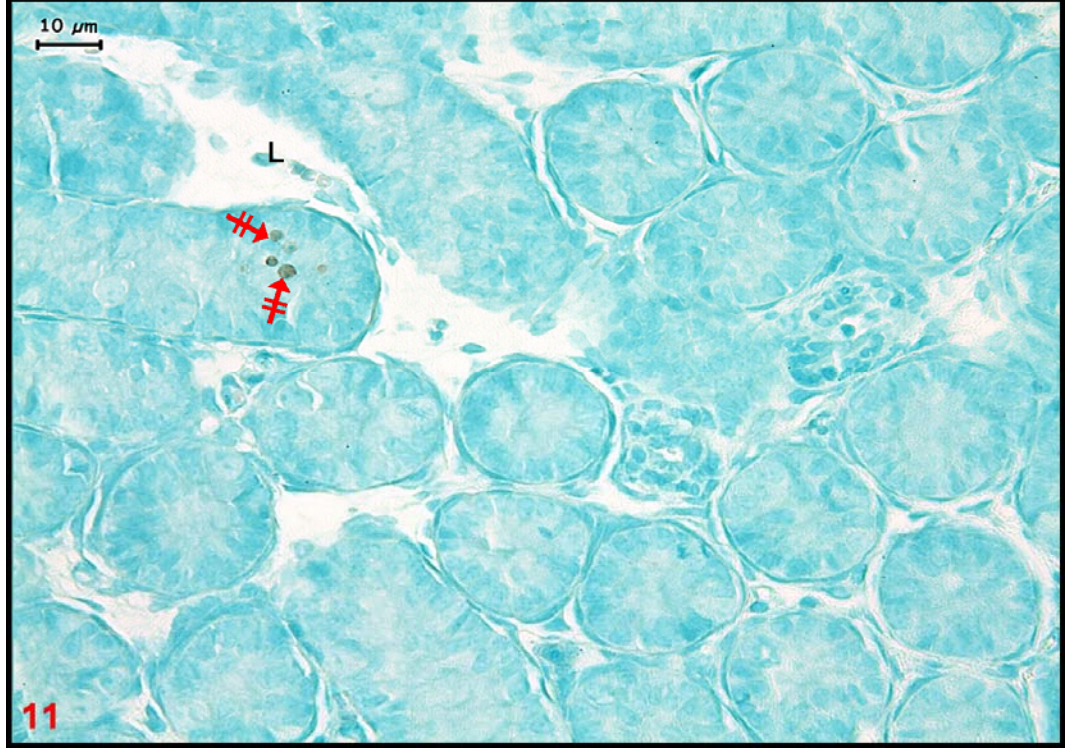
Resim 8: (Grup 8) Gelişimin 21. günü hipoksi grubundan alınan testis dokusuna ait küçük büyütmeli resimde, bazı seminifer tüp lümenlerinin (*) açık olduğu görülüyor. PCNA immünreaktivitesi seminifer tüp epitelinde primer spermatositlerde (⇒) ve spermatosit 2'lerde (⇨) izlenirken, intersitisyel alandaki Leydig hücrelerinde (L) tutulum görülüyor (8Ax400). Büyük büyütmeli resimde PCNA tutulumunun bazı primer spermatositlerde (⇒) olduğu ayırt ediliyor (8Bx1000) (İmmünperoksidaz&Hematoksilen).



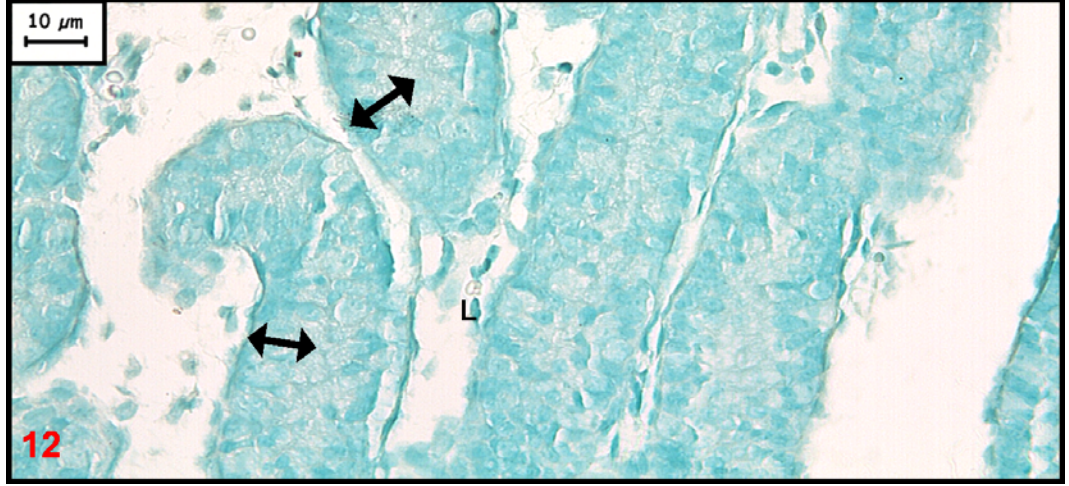
Resim 9: (Grup 9) Gelişimin 21. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan deney grubundan alınan testis dokusunda küçük büyültmeli resimde; açık olan seminifer tüp lümenleri (*) görülüyor (9Ax400). Büyük büyültmede açık olan seminifer tüp lümeni (*), immünpozitif primer spermatositler (⇌), spermatogonyumlar (→) ve spermatosit 2'ler (⇨) dikkati çekiyor (9Bx1000) (İmmünperoksidaz&Hematoksilen).



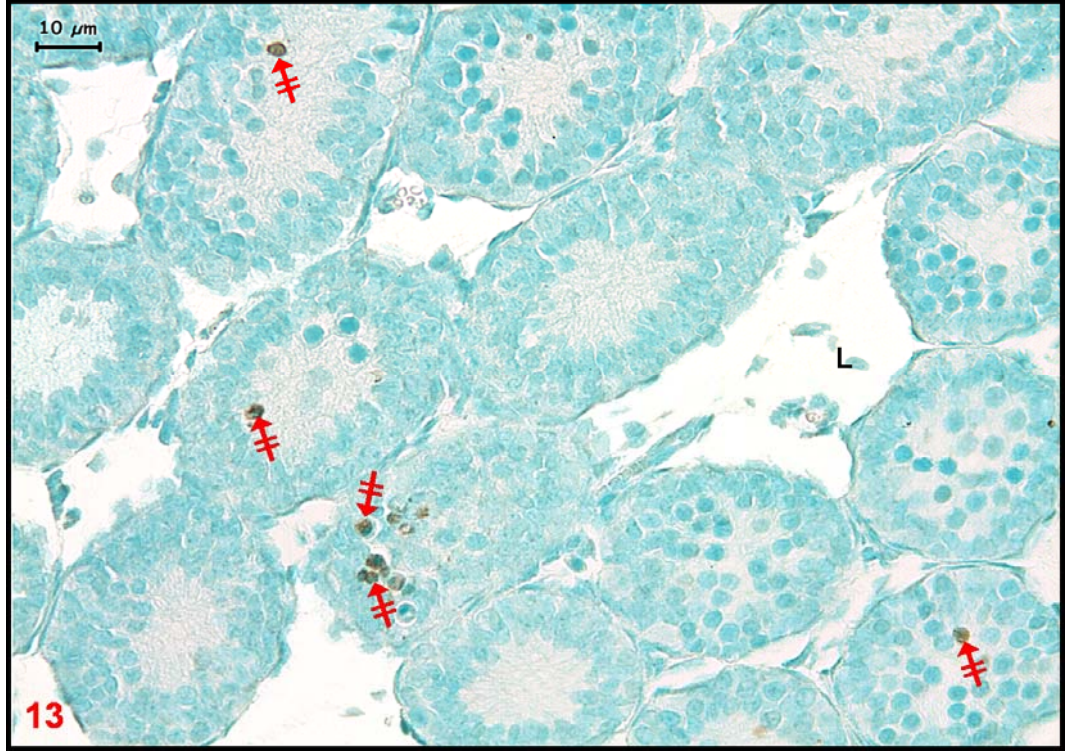
Resim 10: (Grup 1) Gelişimin 7. günü kontrol grubunda testis dokusunun TUNEL yöntemi ile yapılan değerlendirmesinde; seminifer tüp epitelinde spermatogenik seriyi oluşturan hücrelerde (↔) ve Leydig hücrelerinde (L) apoptozis gözlenmiyor (10x400) (TUNEL&Metil Yeşil).



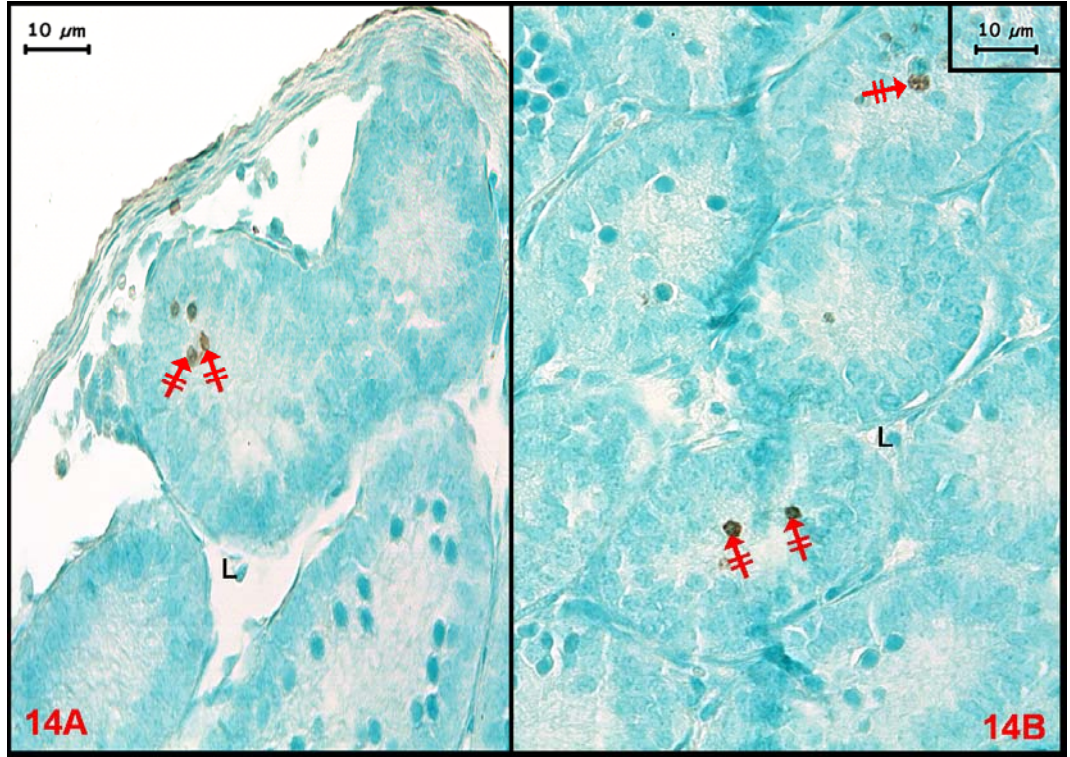
Resim 11: (Grup 2) Gelişimin 7. günü hipoksi grubunda testis dokusunda; TUNEL yöntemi ile bazı seminifer tüp hücrelerinde apoptozis (¶) gözlenirken Leydig hücrelerinin (L) TUNEL negatif oldukları görülüyor (11x400) (TUNEL&Metil Yeşil).



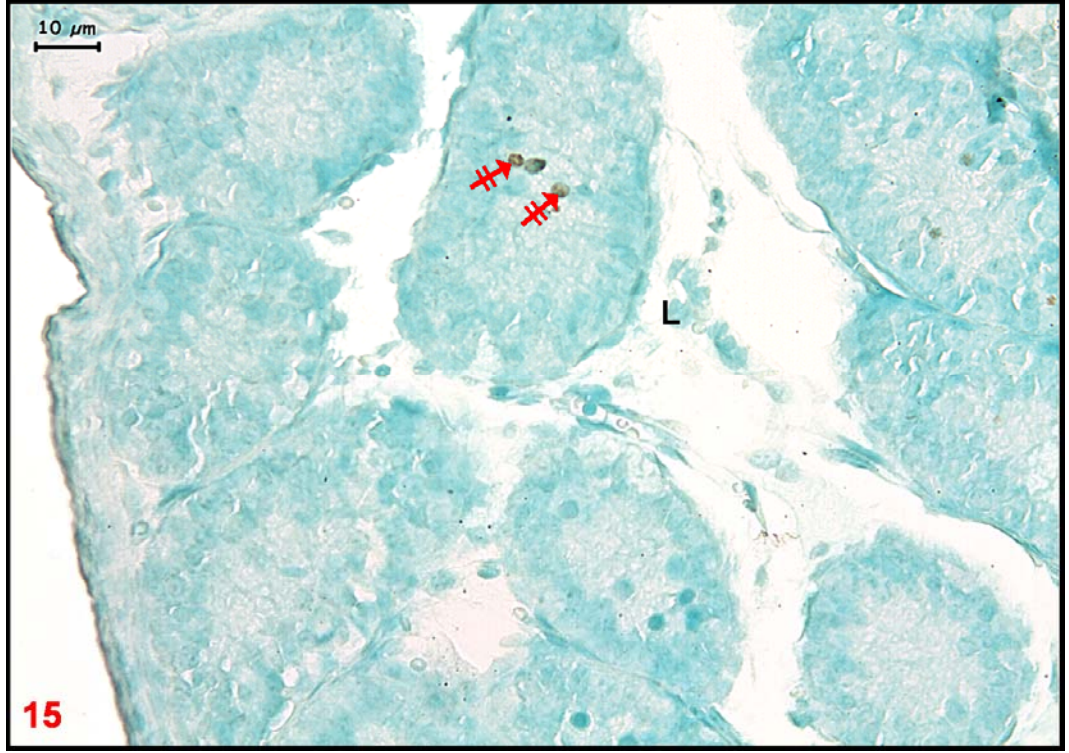
Resim 12: (Grup 3) Gelişimin 7. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan deney grubundan alınan testis dokusunun TUNEL yöntemi ile yapılan değerlendirilmesinde; seminifer tüp epitelinde (↔) ve Leydig hücrelerinde (L) apoptozis gözlenmiyor (12x400) (TUNEL&Metil Yeşil).



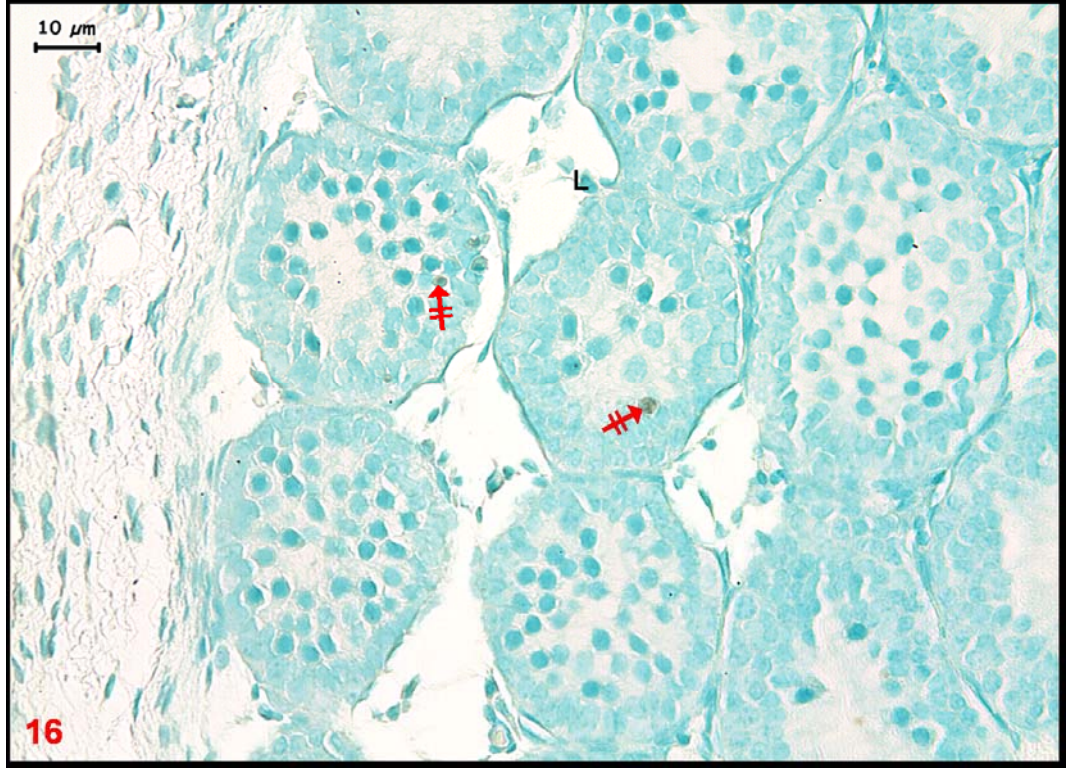
Resim 13: (Grup 4) Gelişimin 14. günü kontrol grubunda testis dokusunda; TUNEL yöntemi ile seminifer tüp hücrelerinin bazılarında apoptozis (‡) ayırt edilirken, intersitisyel alandaki Leydig hücrelerinin (L) TUNEL negatif oldukları görülüyor (13x400) (TUNEL&Metil Yeşil).



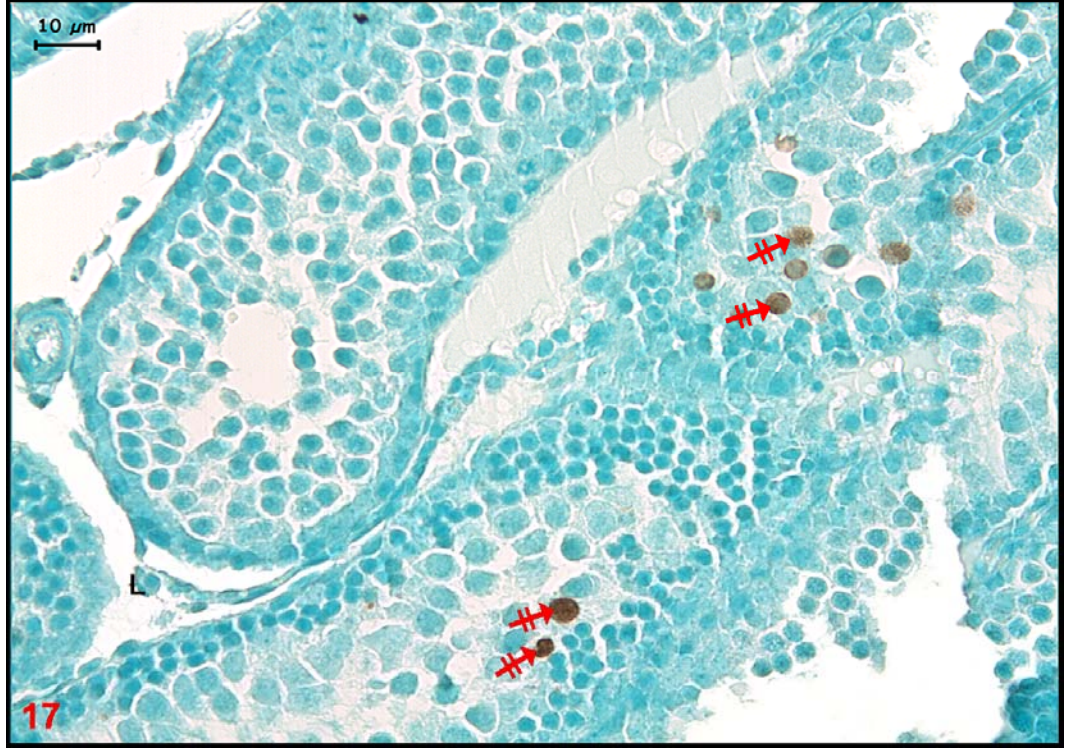
Resim 14: (Grup 5) Gelişimin 14. günü hipoksi grubunda testis dokusunun TUNEL yöntemi ile yapılan değerlendirilmesinde; TUNEL pozitif hücreler (#) görülürken Leydig hücrelerinde (L) apoptozis olmadığı ayırt ediliyor (14A-14Bx400) (TUNEL&Metil Yeşil).



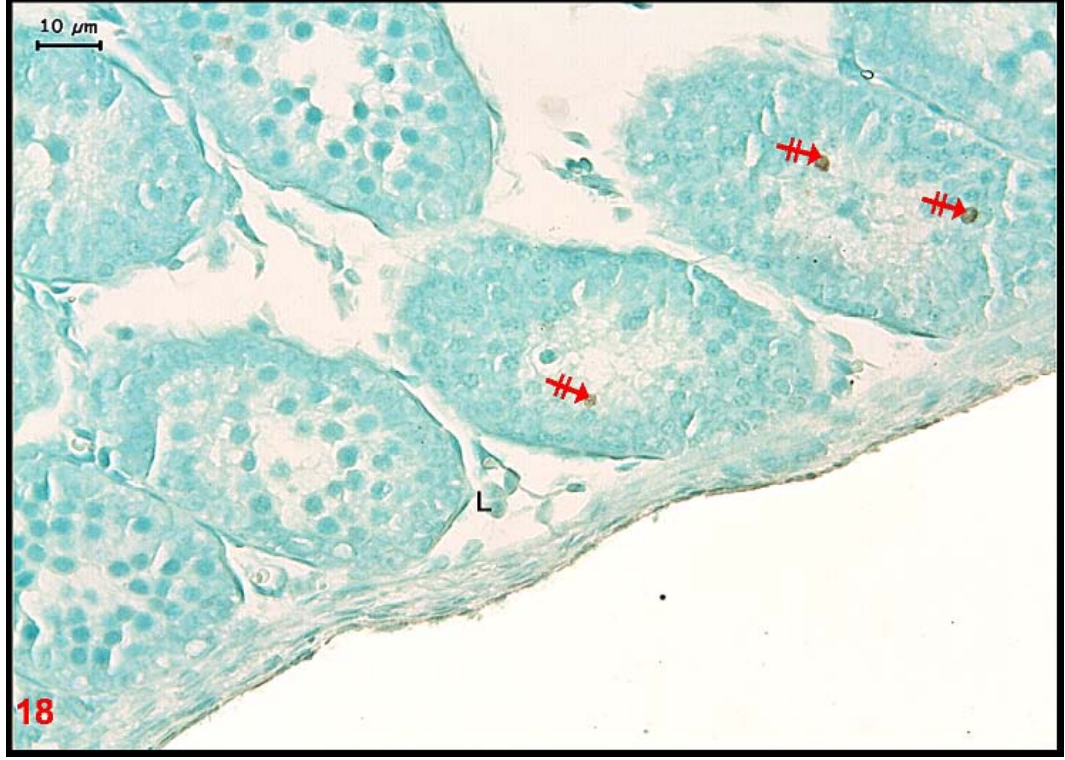
Resim 15: (Grup 6) Gelişimin 14. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan deney grubunda testis dokusunun TUNEL yöntemi ile yapılan değerlendirilmesinde; bazı hücrelerin TUNEL pozitif (✕) oldukları görülürken Leydig hücrelerinde (L) apoptozis izlenmiyor (15x400) (TUNEL&Metil Yeşil).



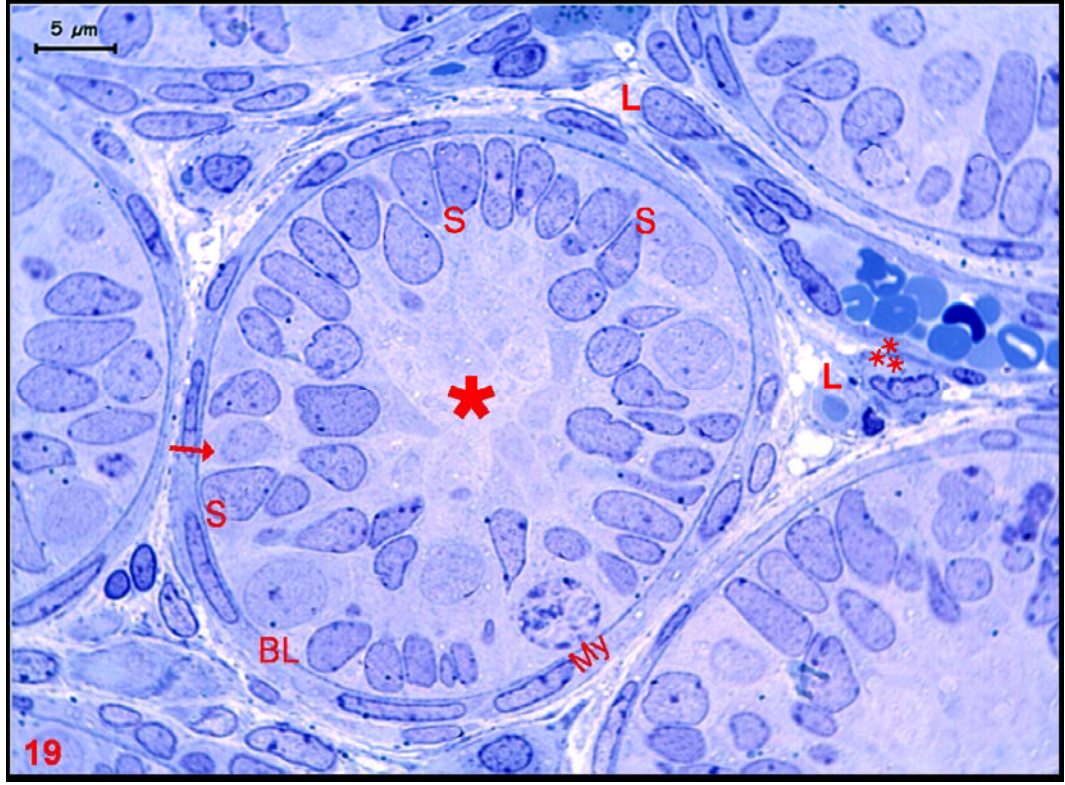
Resim 16: (Grup 7) Gelişimin 21. günü kontrol grubunda testis dokusunda; TUNEL yöntemi ile bazı seminifer tüplerde apoptozis (‡) gözlenirken, intersitisyel alandaki Leydig hücrelerinin (L) TUNEL negatif oldukları ayırt ediliyor (16x400) (TUNEL&Metil Yeşil).



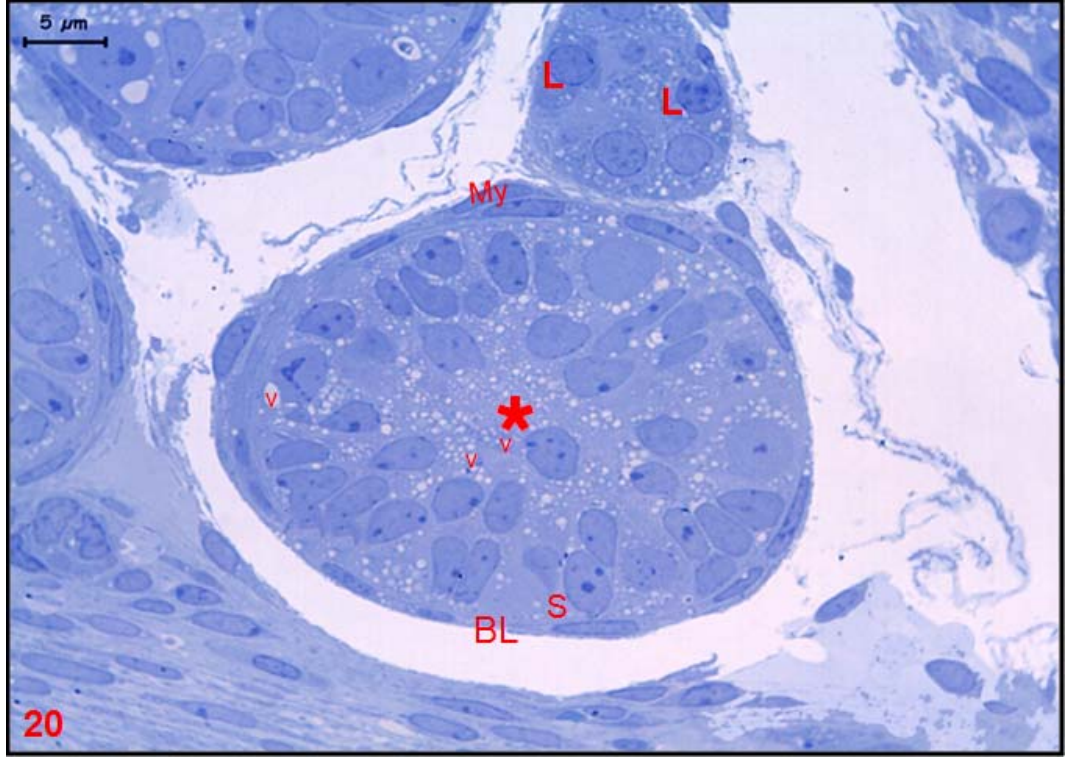
Resim 17: (Grup 8) Gelişimin 21. günü hipoksi grubunda testis dokusunun TUNEL yöntemi ile yapılan değerlendirmesinde; TUNEL pozitif hücrelerin (†) yoğunluğu dikkati çekerken, intersitisyel alanda Leydig hücrelerinde (L) apoptozis görülüyor (17x400) (TUNEL&Metil Yeşil).



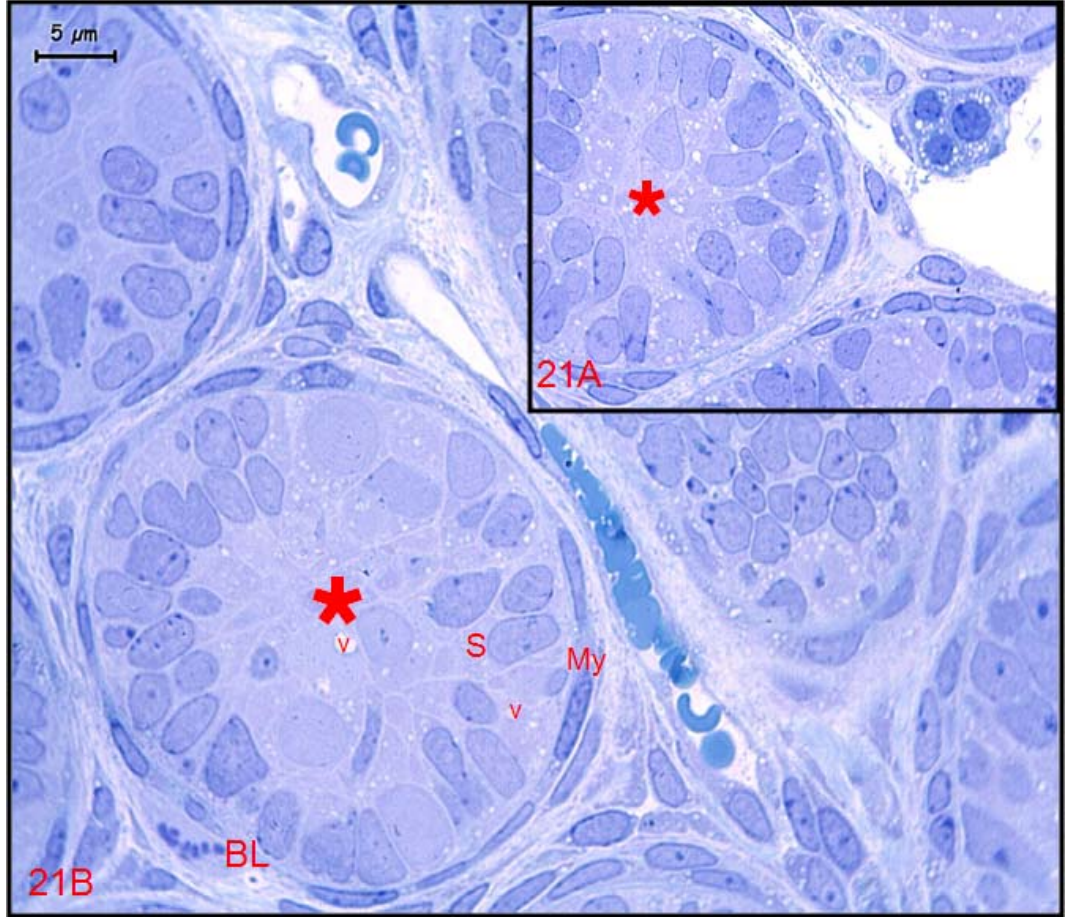
Resim 18: (Grup 9) Gelişimin 21. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan deney grubunda testis dokusunda; TUNEL yöntemi ile bazı seminifer tüplerde apoptozis (‡) gözlenirken, Leydig hücrelerinin (L) TUNEL negatif oldukları görülüyor (18x400) (TUNEL&Metil Yeşil).



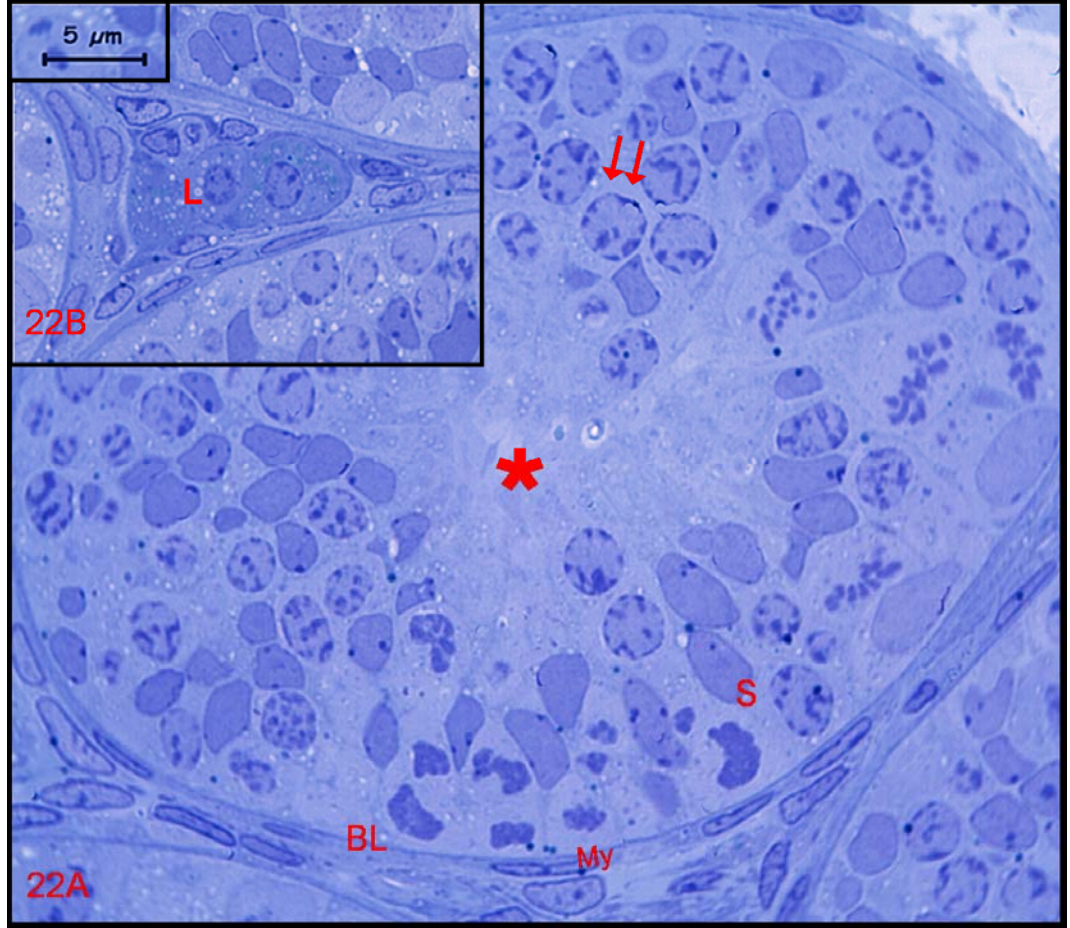
Resim 19: (Grup 1) Gelişimin 7. günü kontrol grubunda testis dokusuna ait yarı ince kesitlerde; Sertoli hücreleri (S), spermatogonyumlar (→), kapalı seminifer tüp lümenleri (*), epitel bazal laminası (BL) ve myoid hücreler (My), intersitisyel alanda gelişkin damarlar (**) ve inaktif Leydig hücreleri (L) gözleniyor (19x1000) (Toluidin Mavisi).



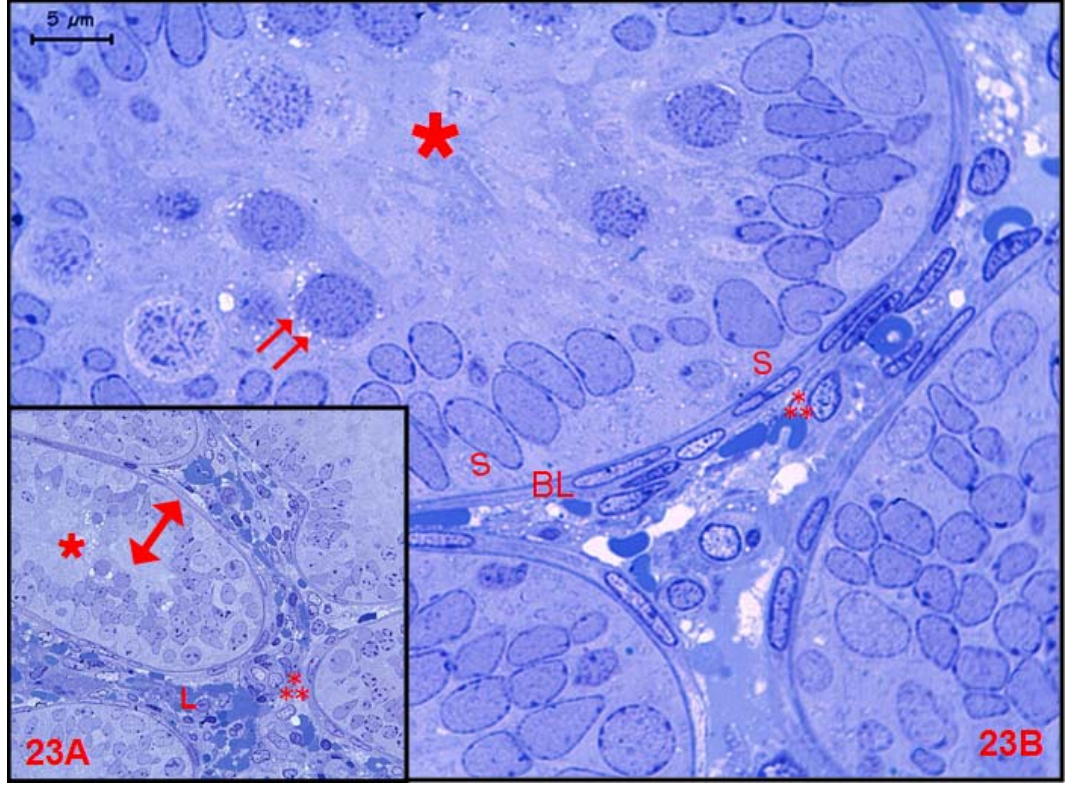
Resim 20: (Grup 2) Gelişimin 7. günü hipoksi grubuna ait testis dokusunun yarı ince kesitlerinde; Sertoli hücreleri (S), kapalı seminifer tüp lümenleri (*), epitel bazal laminası (BL) ve myoid hücreler (My), intersitisyel alanda inaktif Leydig hücreleri (L) gözlenirken, seminifer tüplerde vakuolizasyon (V) dikkati çekiyor (20x1000) (Toluidin mavisi).



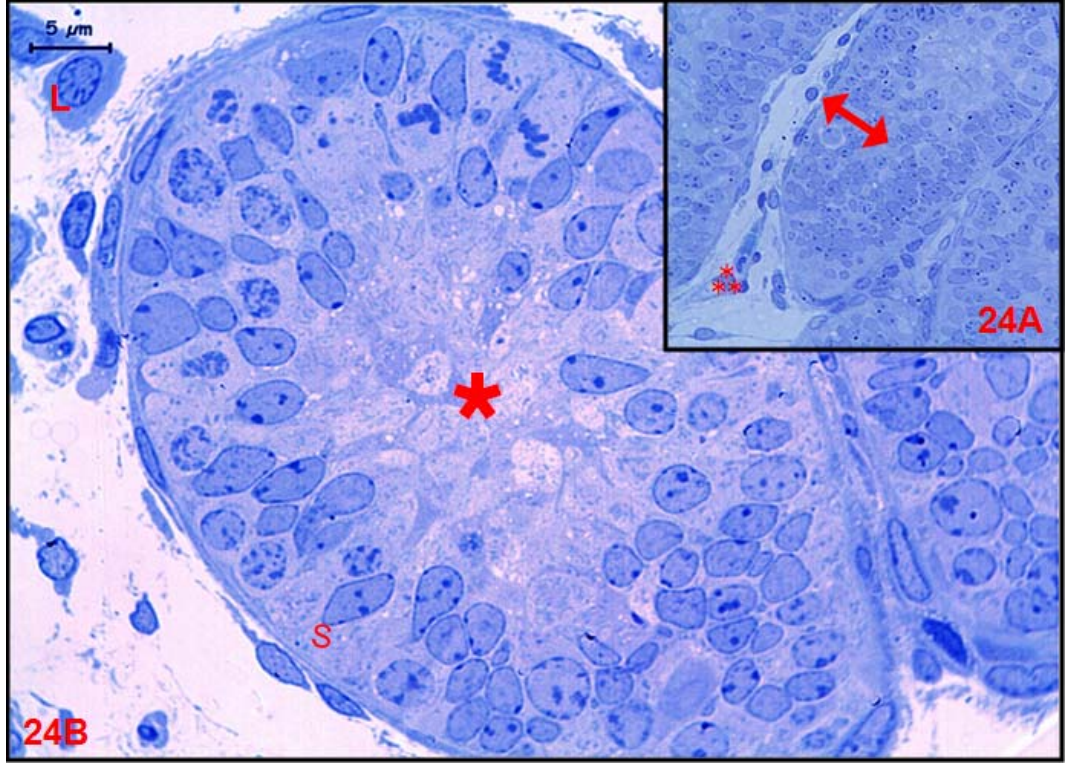
Resim 21: (Grup 3) Gelişimin 7. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan deney grubundan alınan testis dokusunun yarı ince kesit görüntüsünde; Sertoli hücreleri (S), kapalı seminifer tüp lümenleri (*), epitel bazal laminası (BL) ve myoid hücreler (My), seminifer tüplerde vakuolizasyon (V) görülüyor (21A-21Bx1000) (Toluidin Mavisi).



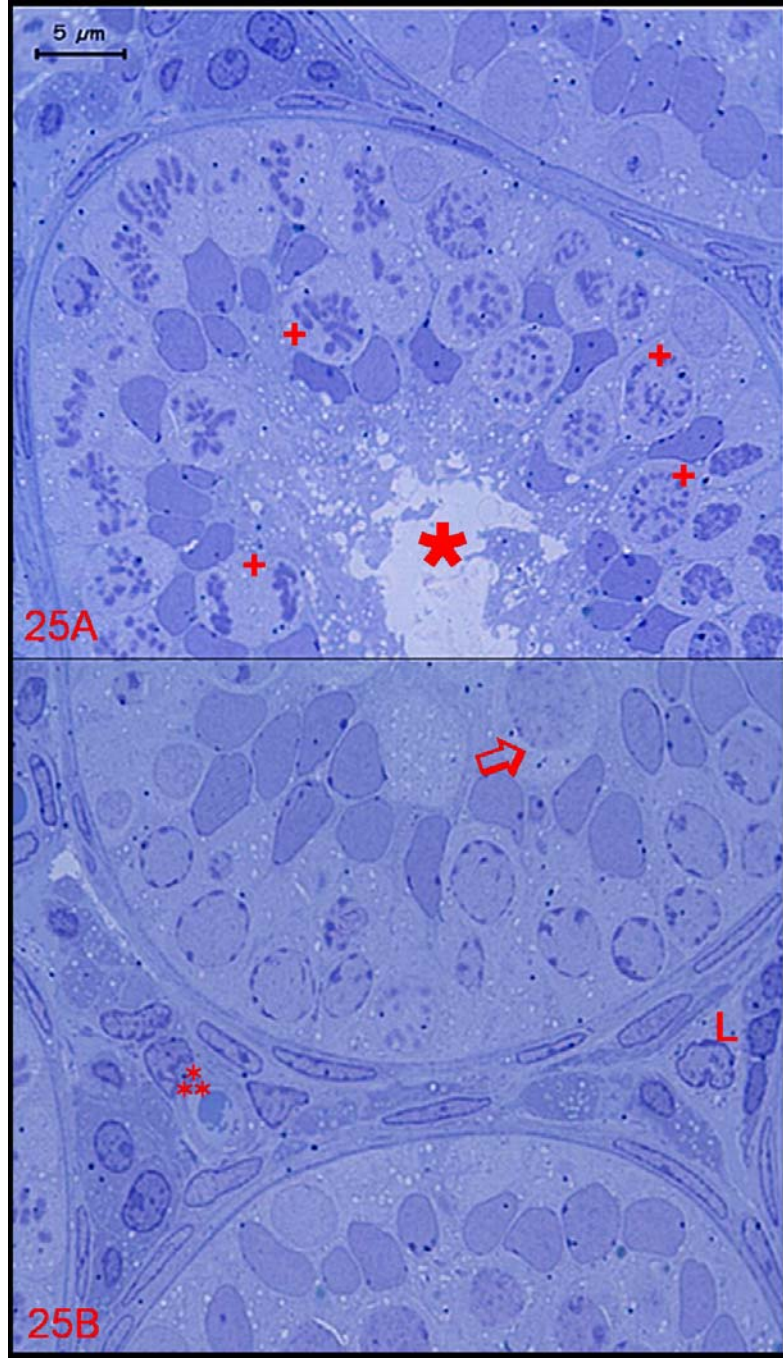
Resim 22: (Grup 4) Gelişimin 14. günü kontrol grubuna ait testis dokusunun yarı ince kesitlerinde; Sertoli hücreleri (S), primer spermatositler ($\Rightarrow$), kapalı seminifer tüp lümenleri (*), epitel bazal laminası (BL), myoid hücreler (My) ve intersitisyel alanda aktifleşen Leydig hücreleri (L) gözleniyor. (22A-22Bx1000) (Toluidin Mavisi).



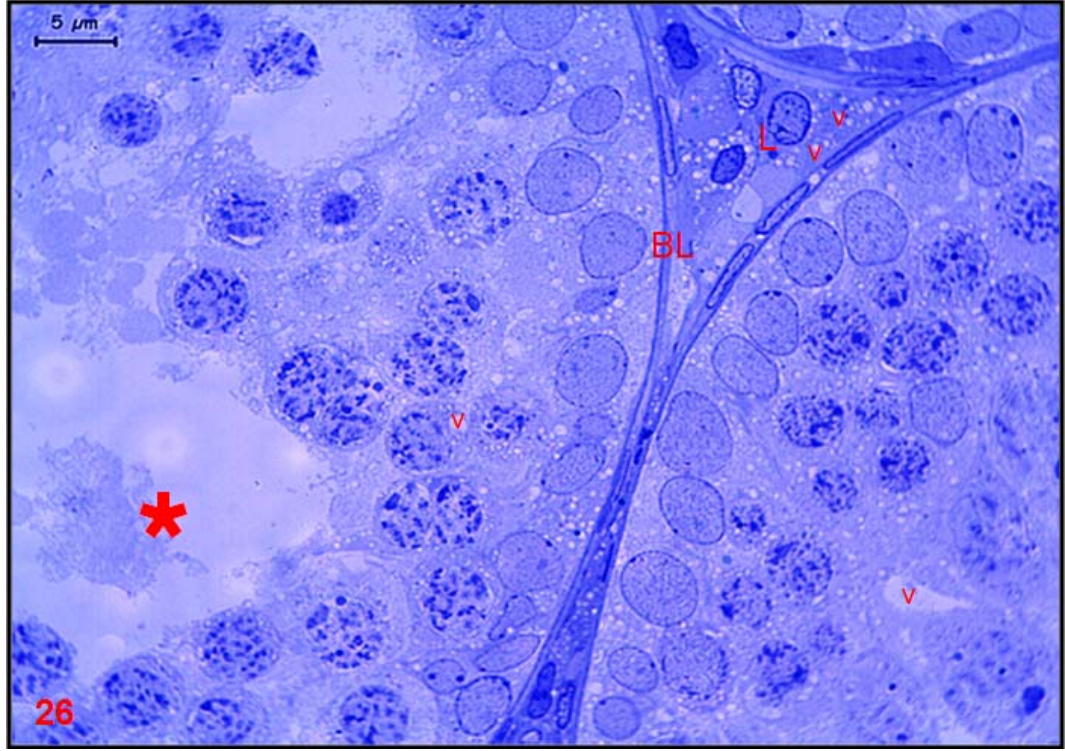
Resim 23: (Grup 5) Gelişimin 14. günü hipoksi grubundan alınan testis yarı ince kesitlerinde küçük büyültmede; seminifer tüp epiteli (↔), kapalı seminifer tüp lümenleri (*), intersitisyel alanda kan damarları (***) ve Leydig hücreleri (L) görülüyor (23Ax400). Büyük büyültmede Sertoli hücreleri (S), primer spermatositler (⇌), kapalı seminifer tüp lümenleri (*), epitel bazal laminası (BL) ve intersitisyel alanda kan damarları (***) izleniyor (23Bx1000) (Toluidin Mavisi).



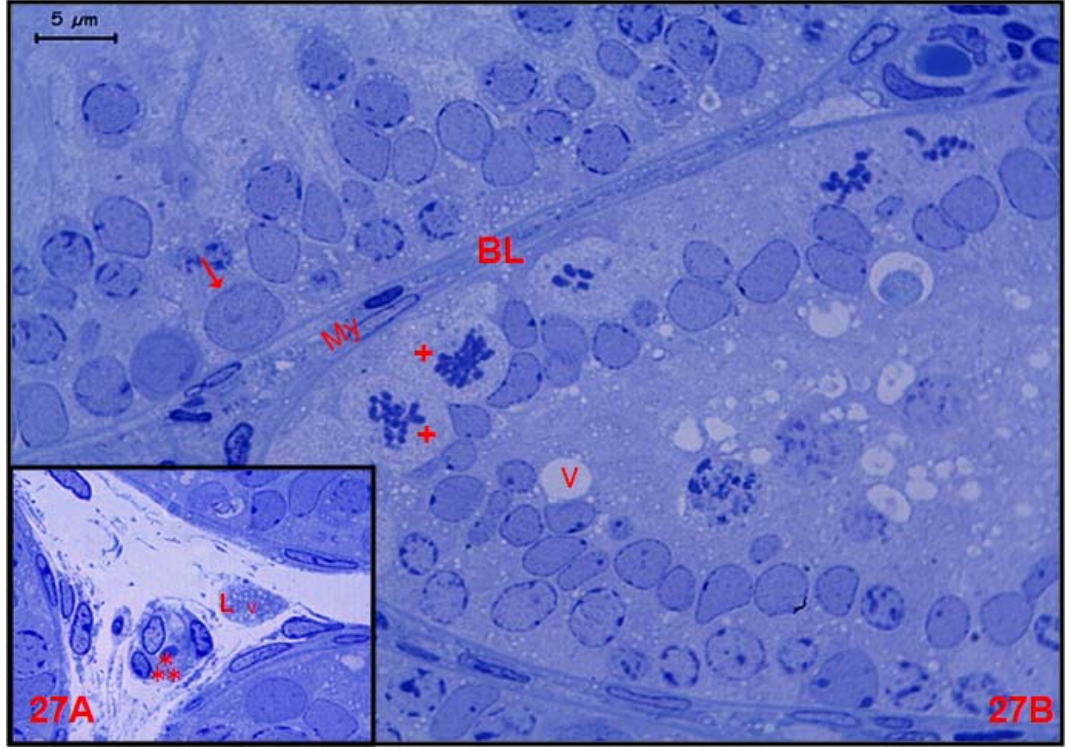
Resim 24: (Grup 6) Gelişimin 14. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan deney grubundan alınan testis dokusunun yarı ince kesitlerinde; küçük büyültmede seminifer tüp epiteli (↔), intersitisyel alanda kan damarları (**) izleniyor. (24Ax400) Büyük büyültmede Sertoli hücreleri (S), kapalı seminifer tüp lümenleri (*), intersitisyel alanda Leydig hücreleri (L) görülüyor (24Bx1000) (Toluidin Mavisi).



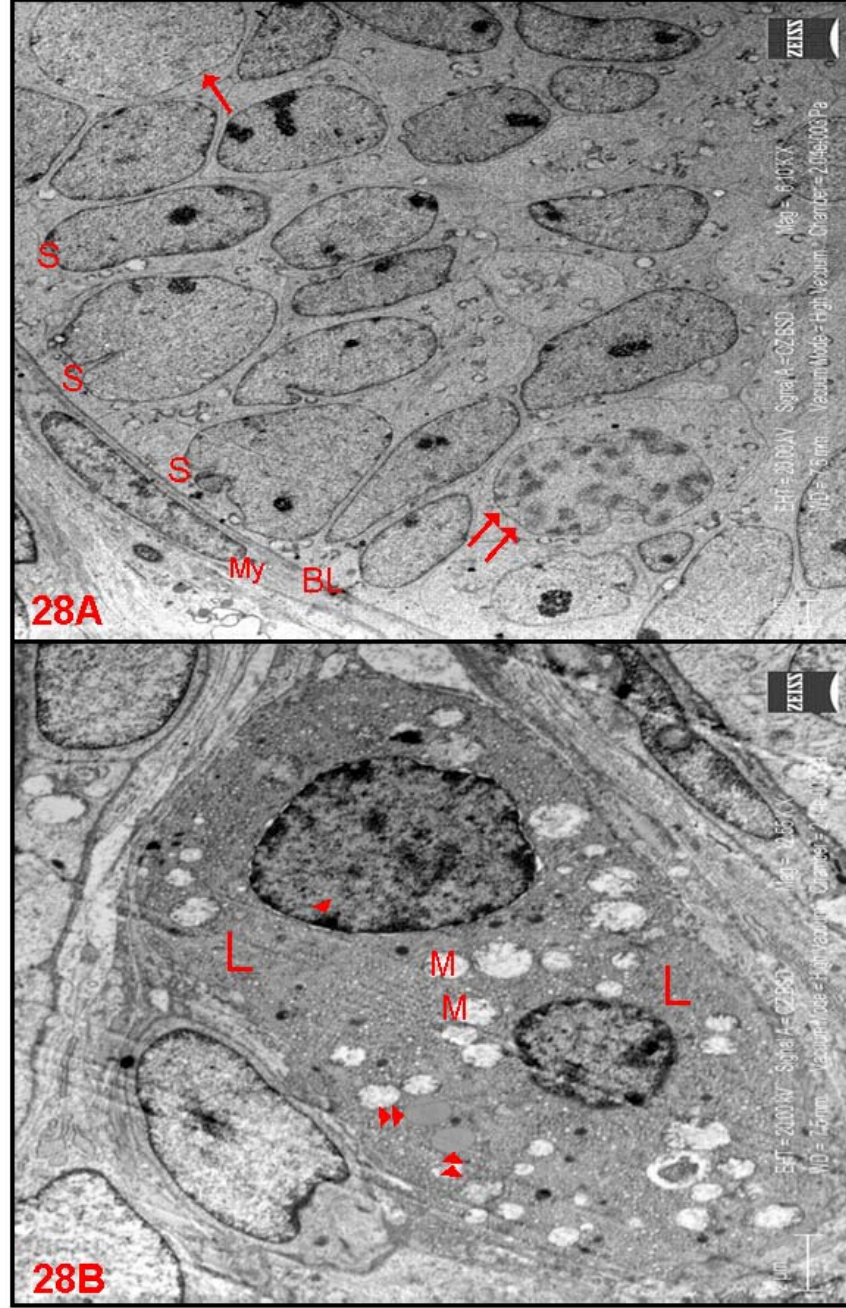
Resim 25: (Grup 7) Gelişimin 21. günü kontrol grubunda testis dokusuna ait yarı ince kesitlerde; bazı seminifer tüp lümenlerinin (*) açık olduğu izlenirken, seminifer epitelde farklı gelişim evrelerinde hücreler (+), spermatosit 2 hücreleri (⇨), intersitisyel alanda kan damarları (**) ve Leydig hücreleri (L) izleniyor (25A-25Bx1000) (Toluidin Mavisi).



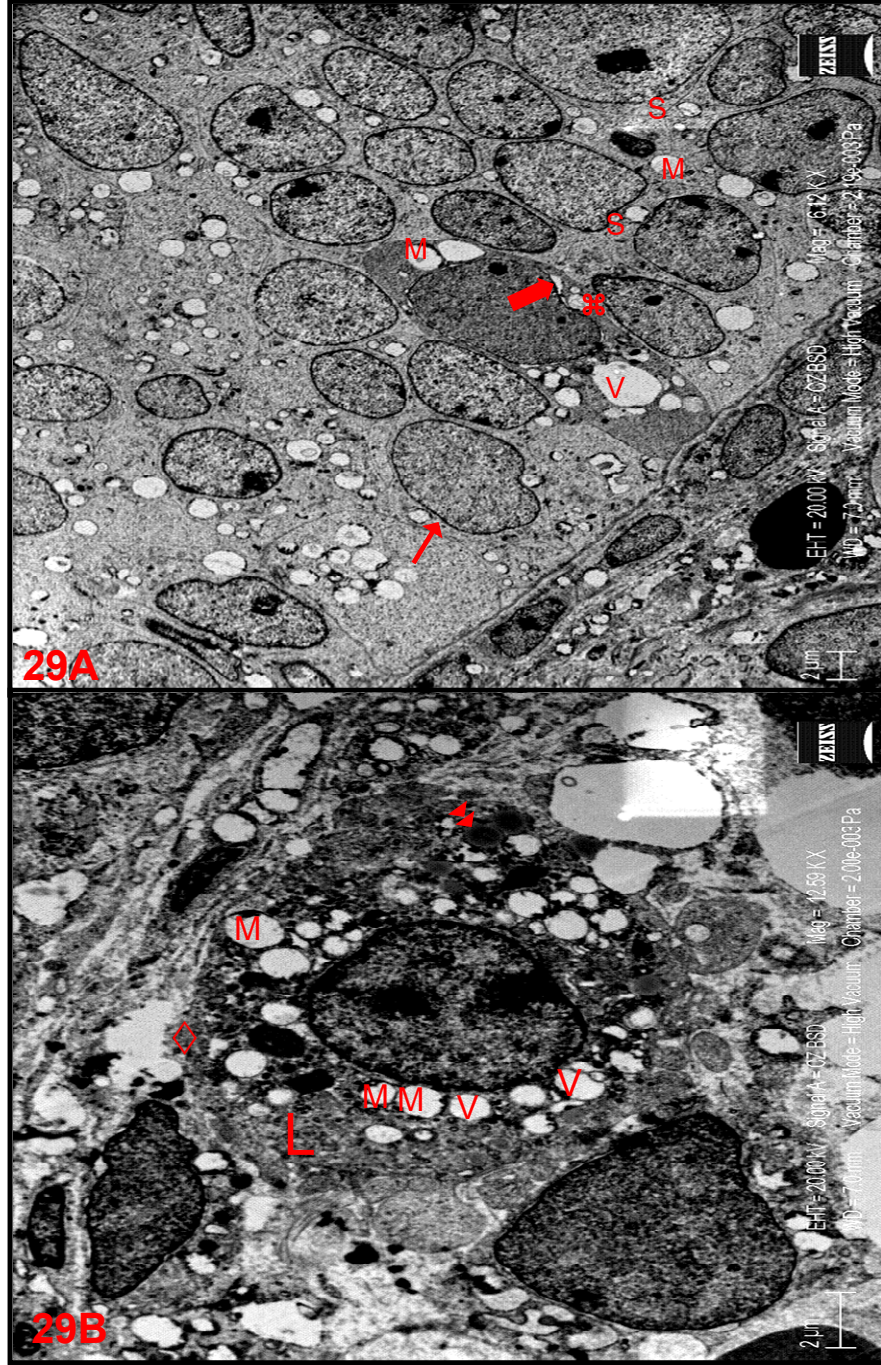
Resim 26: (Grup 8) Gelişimin 21. günü hipoksi grubunda testis dokusuna ait yarı ince kesitlerde; seminifer tüp lümenleri (*), epitel bazal laminası (BL), intersitisyel alanda Leydig hücreleri (L) görülürken, seminifer tüp hücrelerinde ve Leydig hücrelerinde (L) vakuolizasyon (V) dikkati çekiyor (26x1000) (Toluidin Mavisi).



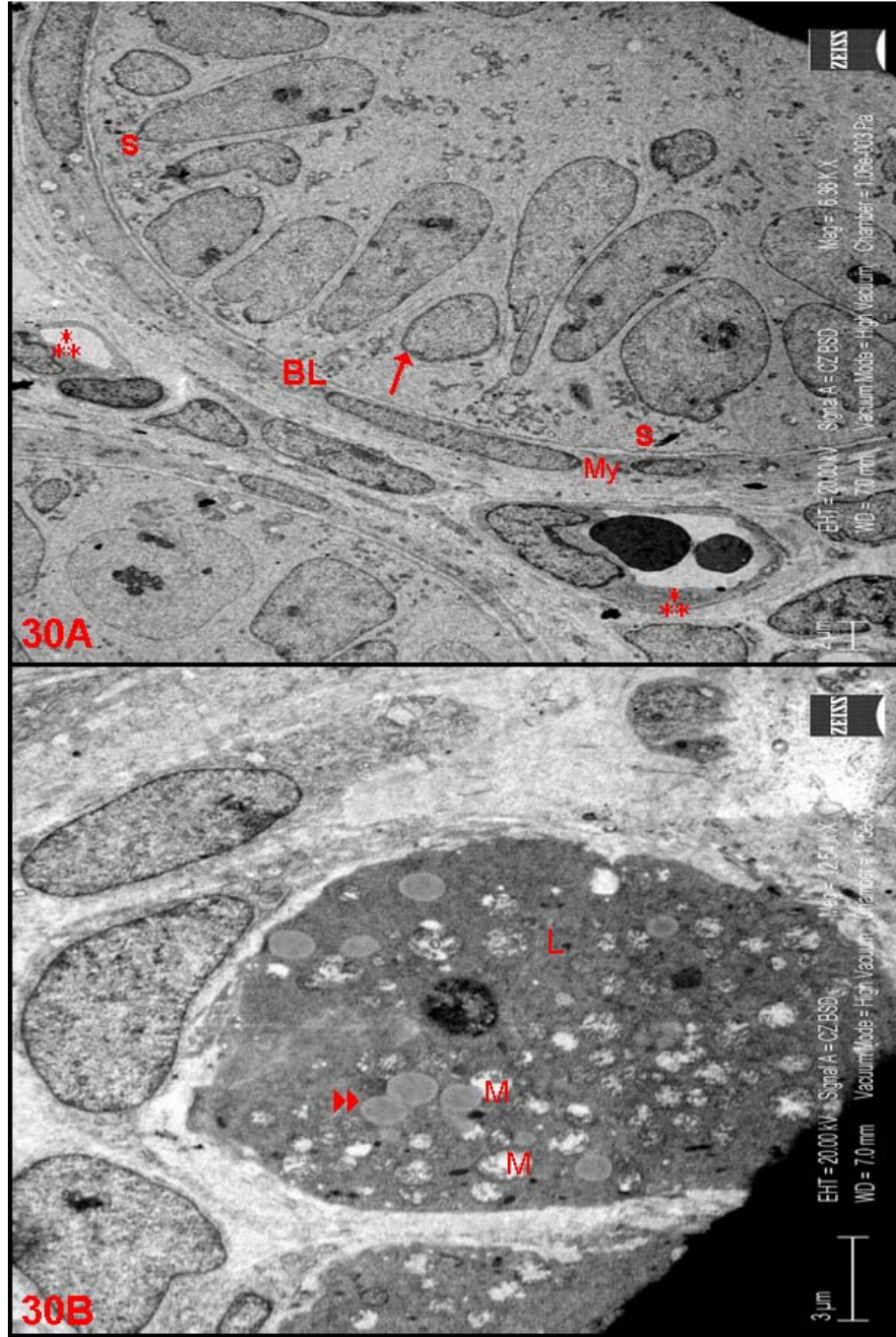
Resim 27: (Grup 9) Gelişimin 21. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan deney grubundan alınan testis dokusunun yarı ince kesitlerinde; epitel bazal laminası (BL), myoid hücreler (My), spermatogonyumlar (→), seminifer epitelde farklı gelişim evrelerinde olan hücreler (+), intersitisyel alanda Leydig hücreleri (L), seminifer tüp hücrelerinde ve Leydig hücrelerinde (L) vakuolizasyon (V) izleniyor (27A-27Bx1000) (Toluidin Mavisi).



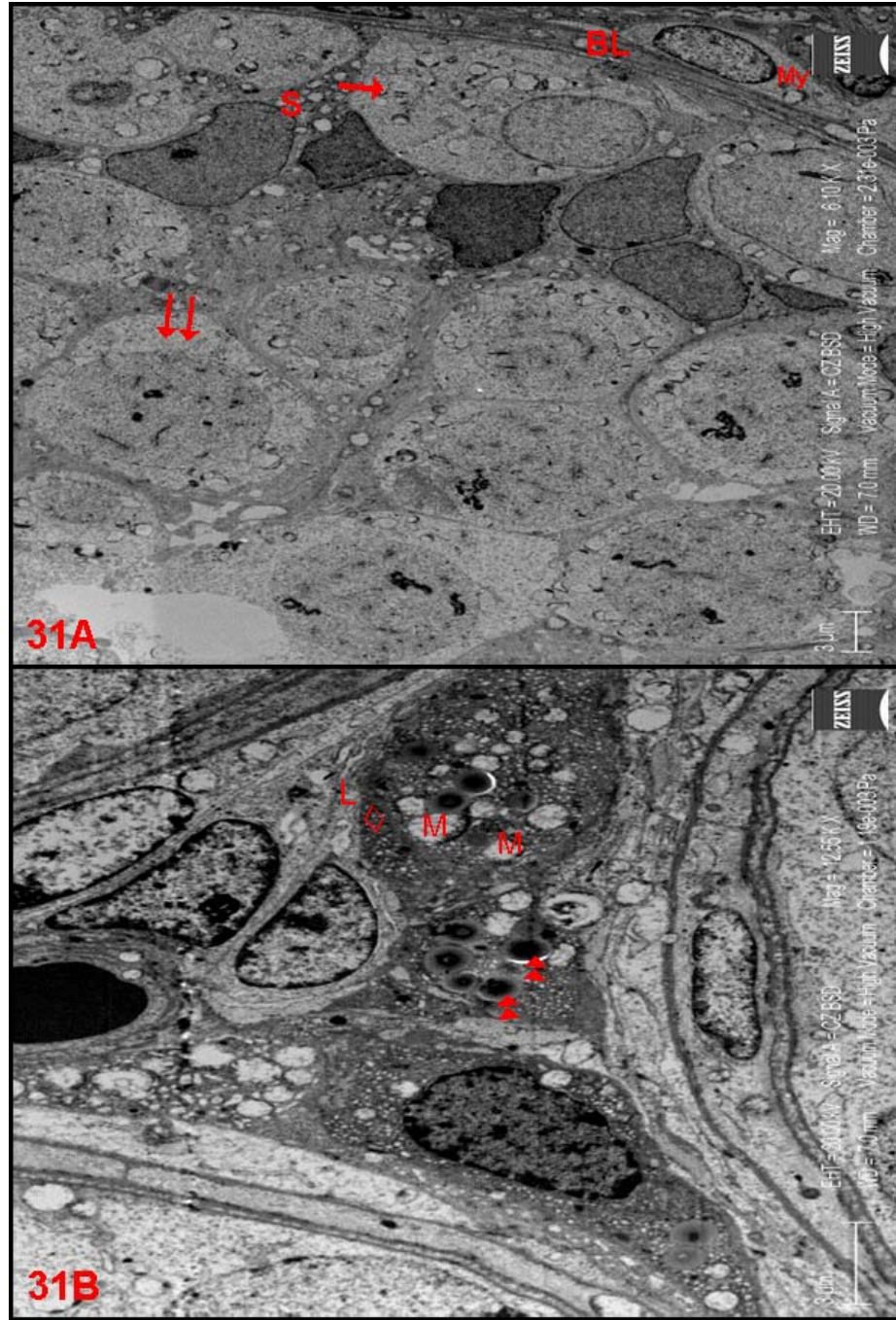
Resim 28: (Grup 1) Gelişimin 7. günü kontrol grubunda testis dokusuna ait elektron mikroskopik incelemelerde; epitel bazal laminası (BL), myoid hücreler (My), Sertoli hücreleri (S), spermatogonyumlar (→), primer spermatositler (⇌) (28Ax6100); Leydig hücreleri (L), çekirdek zarı altında yoğunlaşan kromatin dağılımı (►), mitokondriyonlar (M), lipid damlacıkları (►►) izleniyor (28Bx12550) (Uranil asetat&Kurşun sitrat).



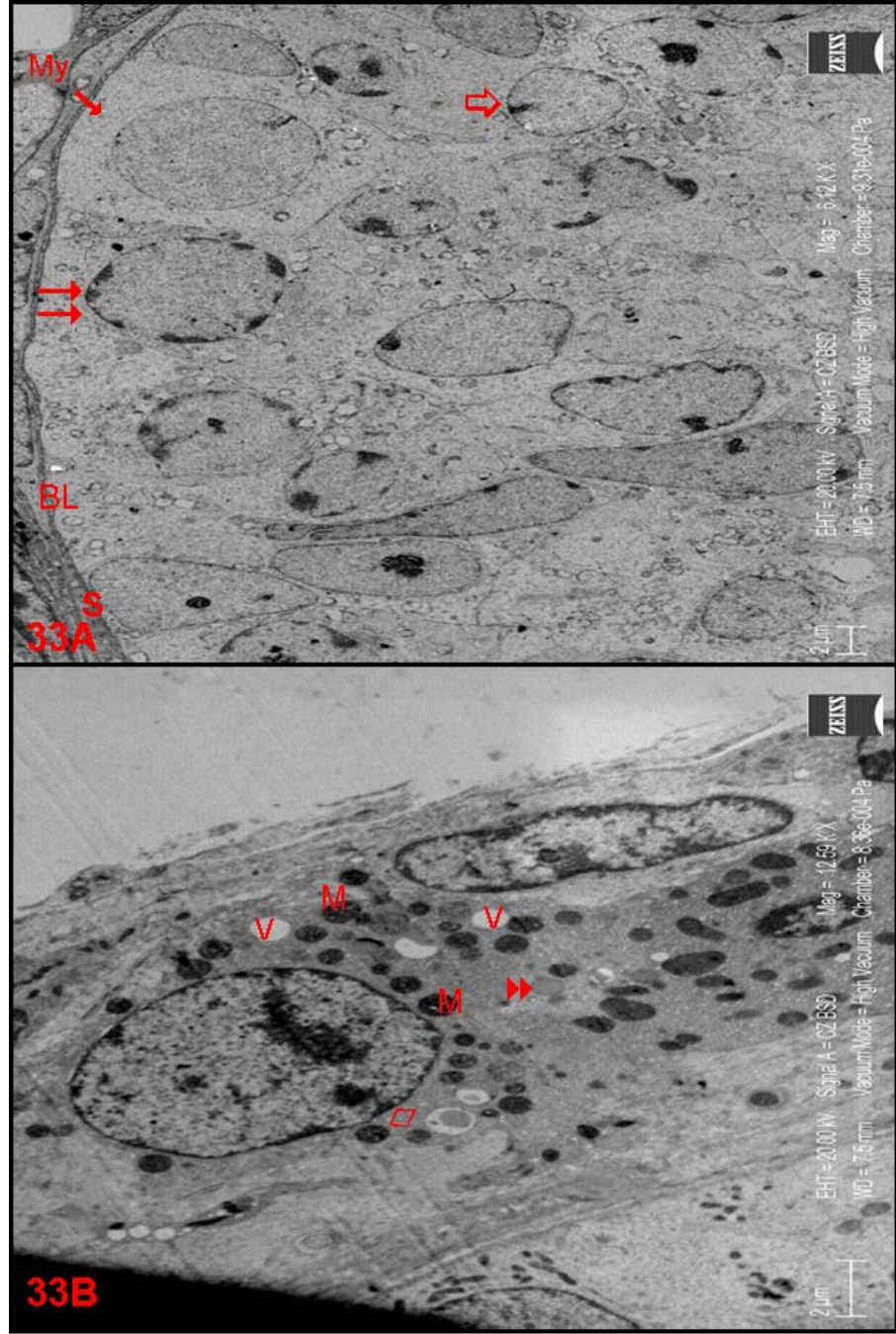
Resim 29: (Grup 2) Gelişimin 7. günü hipoksi grubunda testis dokusunda ince yapı düzeyinde yapılan değerlendirmede; Sertoli hücreleri (S), spermatogonyumlar (→), çekirdek zarında yer yer açılmalar (⌘), mitokondriyonlar (M), vakuoller (V), Sertoli hücre mitokondriyonlarında myelin yapılar (⌘) (29Ax6120); Leydig hücreleri (L), mitokondriyonlar (M), vakuoller (V), sitoplazmada yoğun öz bölgeci lipid damlacıkları (⬢), granülsüz endoplazmik retikulum sisternaları (◇) görülüyor. (29Bx12590) (Uranil asetat&Kurşun sitrat).



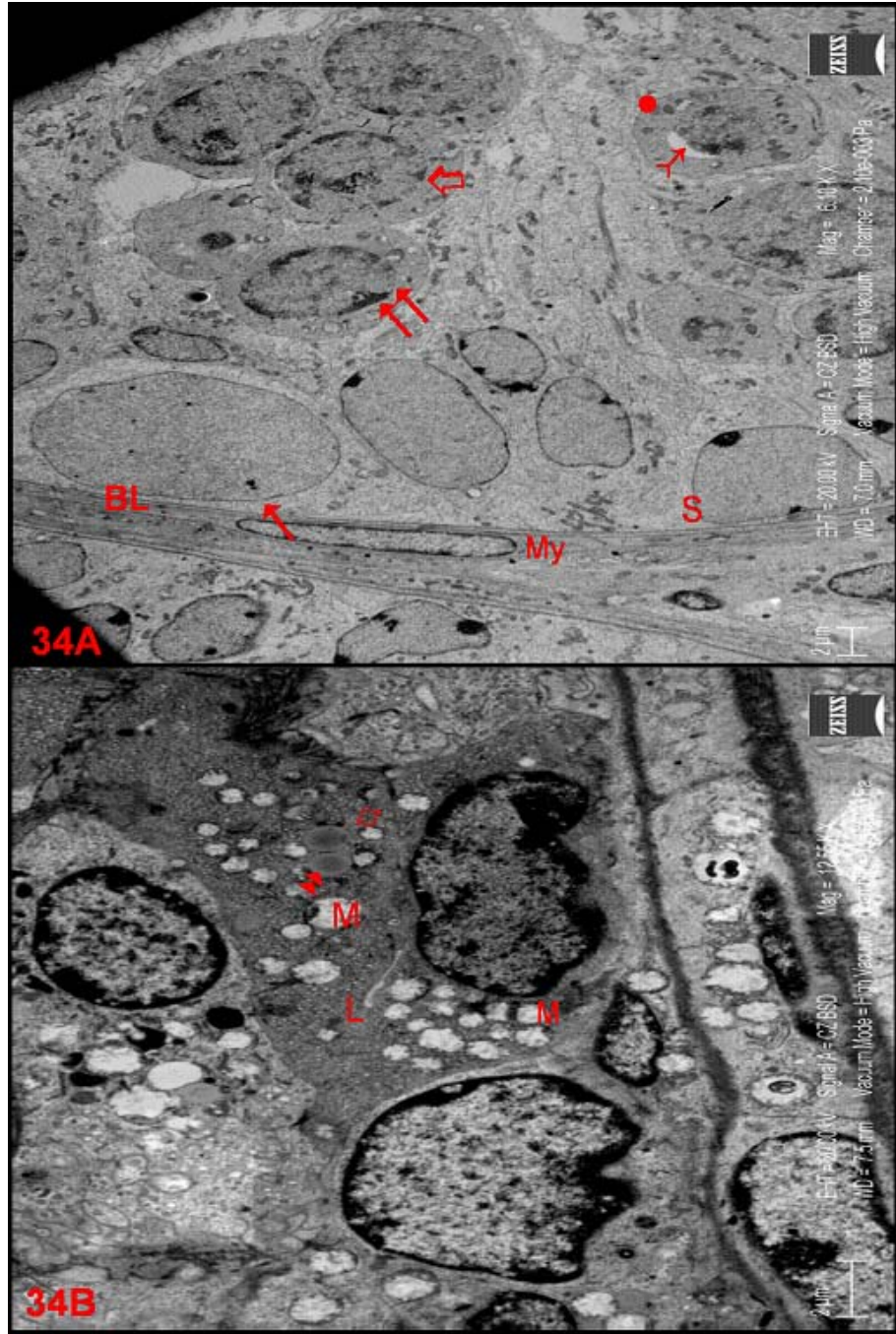
Resim 30: (Grup 3) Gelişimin 7. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan deney grubundan alınan testis dokusunda ince yapı değerlendirmesinde; Sertoli hücreleri (S), spermatogonyumlar (→), epitel bazal laminası (BL), myoid hücreler (My), intersitisyel alanda kan damarları (***) (30Ax6360); Leydig hücreleri (L), lipid damlacıkları (▶▶), mitokondrionlar (M) gözleniyor (30Bx12540) (Uranil asetat&Kurşun sitrat).



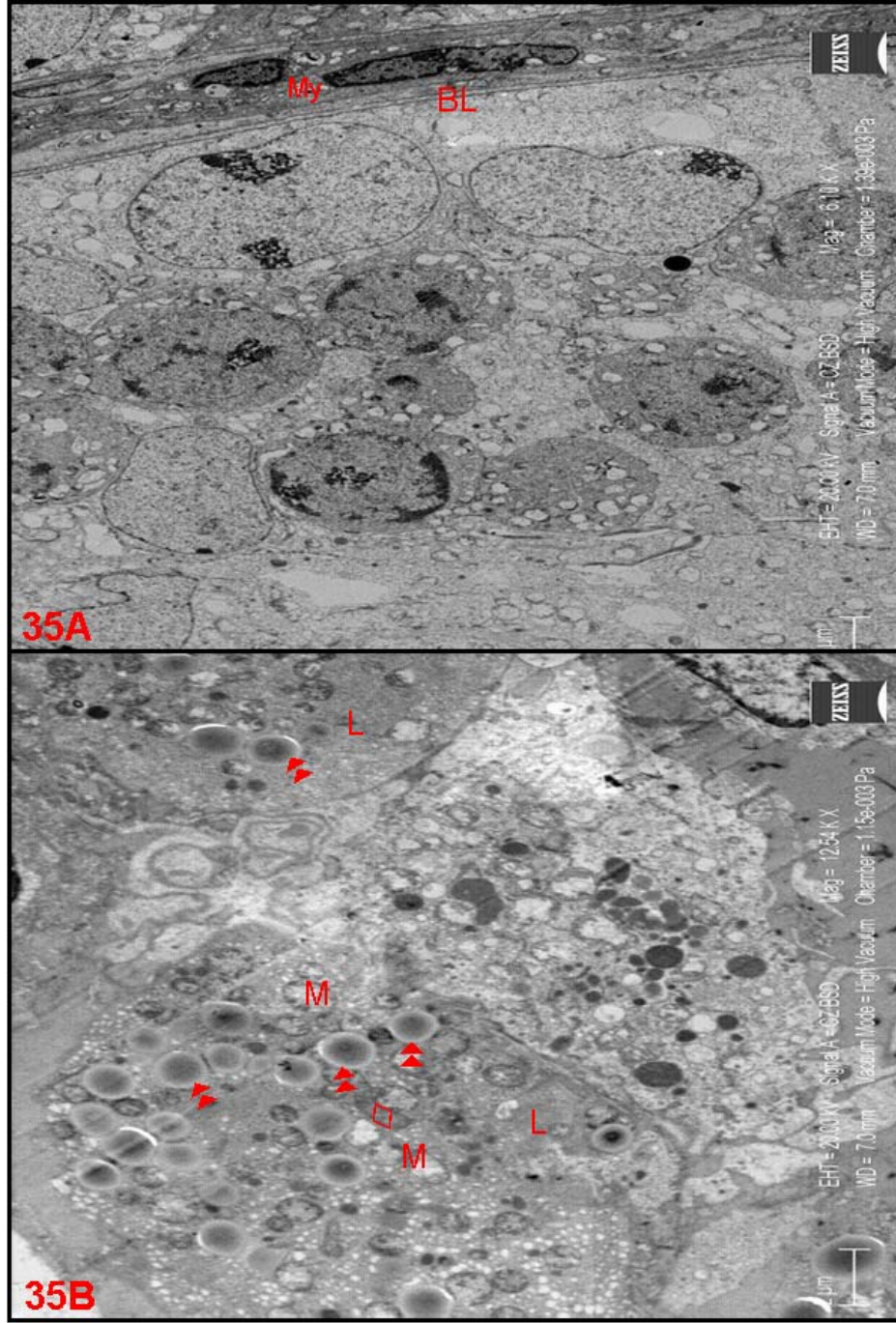
Resim 31: (Grup 4) Gelişimin 14. günü kontrol grubu testis dokusuna ait elektron mikroskopik incelemelerde; seminifer tüp epitelinde Sertoli hücreleri (S), spermatogonyumlar (→), primer spermatositler (⇔), epitel bazal laminası (BL), myoid hücreler (My) (31Ax6100); Leydig hücreleri (L), sitoplazmada yoğun öz bölgesi içeren lipid damlacıkları (lipid droplets), mitokondriyonlar (M), granülsüz endoplazmik retikulum sisternaları (◇) görülüyor (31Ax12550) (Uranil asetat&Kurşun sitrat).



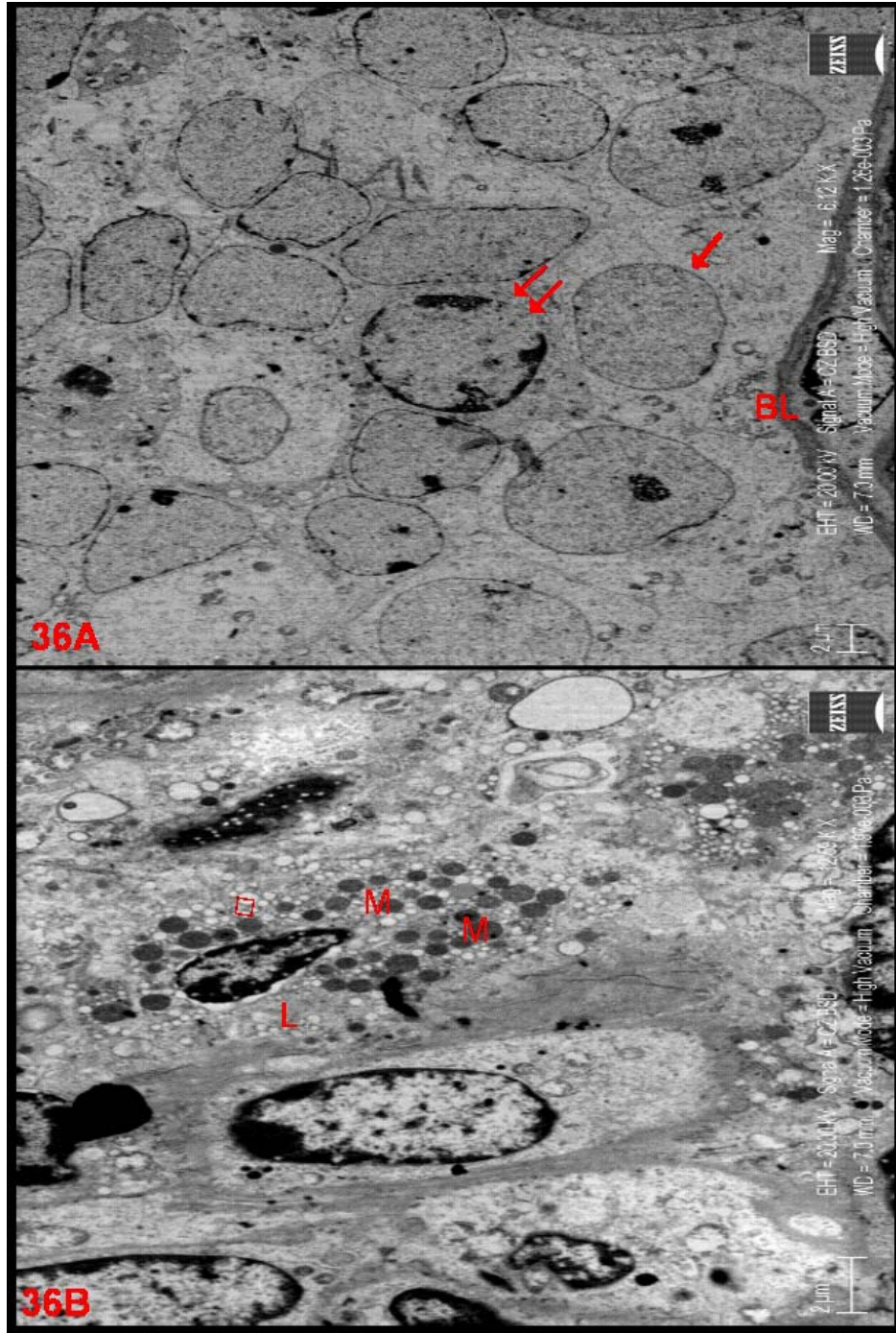
Resim 33: (Grup 6) Gelişimin 14. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan deney grubunda testis dokusuna ait ince yapı değerlendirmesinde; seminifer tüp epitelinde Sertoli hücreleri (S), spermatogonyumlar (→), primer spermatositler (⇌), spermatosit 2'ler (⇨), epitel bazal laminası (BL), myoid hücreler (My) (33Ax6120); Leydig hücrelerinde mitokondriyonlar (M), granülsüz endoplazmik retikulum sisternaları (◇), vakuoller (V), irili ufaklı lipid damlacıkları (▹) gözleniyor (33Bx12590) (Uranil asetat&Kurşun sitrat).



Resim 34: (Grup 7) Gelişimin 21. günü kontrol grubunda testis dokusuna ait elektron mikroskopik incelemelerde; seminifer tüp epitelinde Sertoli hücreleri (S), spermatogonyum (→), primer spermatosit (⇔), akrozomal vezikül (↔), spermatosit 2 (⇔) toplulukları, yuvarlak spermatidler (●), bazal lamina (BL), myoid hücreler (My) (34Ax6100); intersitisyel alanda Leydig hücreleri (L), mitokondriyonlar (M), granülsüz endoplazmik retikulum sisternaları (◇) ve lipid granüllerinde yoğun maddeler (⇨) görülüyor (34Bx12550) (Uranil Asetat&Kurşun Sitrata).



Resim 35: (Grup 8) Gelişimin 21. günü hipoksi grubunda testis dokusunda ince yapı düzeyinde yapılan değerlendirmede; bazal lamina (BL), myoid hücreler (My) (35Ax6100), intersitisyel alanda Leydig hücreleri (L), mitokondriyonlar (M), granülsüz endoplazmik retikulum sisternaları (◇) ve lipid granüllerinde yoğun maddeler (►►) izleniyor (35Bx12540) (Uranil Asetat&Kurşun Sitrat).



Resim 36: (Grup 9) Gelişimin 21. günü hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan deney grubundan alınan testis dokusunda yapılan elektron mikroskopik değerlendirilmede; primer spermatositler (⇔), bazal lamina (BL), spermatogonyum (→) (36Ax6120); intersitisyel alanda Leydig hücreleri (L) , granülsüz endoplazmik retikulum sisternaları (◇) ve mitokondriyonlar (M) görülüyor (36Bx12590) (Uranil Asetat & Kurşun Sitrat).

5. TARTIŞMA

Hipoksi, organizmada dokunun gereksinim duyduğu oksijenin yeterli düzeyde alınamaması veya kullanılamaması olgusudur.^{3,10,11} Dokularda hasara yol açan oksidatif stresi uyarır.¹⁶ Hipoksik ya da hipobarik hipoksi ise genelde yüksek irtifalarda gerçekleşir.⁴ Azalan barometrik basınç nedeniyle parsiyel oksijen basıncının (PO_2) düştüğü koşullarda ortaya çıkar.^{5,9,10} Oksijen alımının azlığı seminifer epiteli de kapsayan pek çok dokuya hasar vermektedir.⁹ Hipoksi ile hücrelerdeki antioksidan sistem engellenerek, serbest oksijen radikallerinin üretimi artmaktadır. Bu artışla birlikte biyomoleküllerin oksidatif hasarı gerçekleşir. Ayrıca platelet aktive edici faktör (PAF) miktarı da artar.^{14,15,16} Doğum öncesi evrede ise hipoksi süresi uzadıkça, intrauterin gelişme geriliği görülür. Miyadından önce doğumlar ve daha düşük ağırlıkta bebek doğumları gerçekleşir. Perinatal mortalite ve morbidite oranı artar.¹⁷

Yapılan kaynak taramalarında, hipoksik koşullar altında büyüme, gelişme ve üremeyi inceleyen birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak kronik hipoksiye etkin kalan gebe sıçanların yavrularında, hipoksinin testis gelişimi üzerine olası etkileri ile ilgili fazla bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca kronik hipoksik gebe sıçanların yavrularında in vivo olarak doğum sonrası süreçte Ginkgo biloba'nın testiste koruyucu ya da tedavi edici etkisinin tartışıldığı yapısal bir çalışmaya da rastlanmamıştır.

Atış, yaptığı derlemesinde; yüksek irtifada barometrikbasıncındaki azalmaya koşut ortaya çıkan solunan oksijen basıncındaki düşme sonucunda organizmada bazı fizyolojik değişikliklerin

görüldüğünü ve bunu izleyerek uyum mekanizmalarının geliştiğini belirtmiştir. Genelde ilk 5 gün içerisinde belirgin bir uyum geliştiği bildirilmiştir. Uzun süre yüksek rakımda yaşayan insanlarda yapılan çalışmalar, oksijen alımı ve taşınımı ile ilişkili olarak bu kişilerin solunum, kalp-damar ve hematolojik sistemlerinde uyum oluştuğunu göstermiştir. Bu nedenle yüksek irtifada yaşayanlarda bazı rahatsızlıklar olaylanmakla birlikte, akut dağ hastalığı, yüksek irtifa serebral ödemi gibi acil tıbbi olgular daha çok uyumun gelişemediği kişilerde izlenmektedir.⁶

Bakonyi ve Radak ise yayınladıkları derlemede; yüksek irtifaya etkin kalmanın, oksijen basıncının azalması ve genelde DNA, protein, lipidlerin oksidatif hasarında artan reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin artması ile sonuçlandığını, antioksidan sistem erkinin azalarak etkisiz hale geldiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılara göre, yüksek irtifa ile ilişkili hipoksinin DNA, protein ve lipidlerin oksidatif hasarına neden olduğu sonucu, insanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda birbirleriyle uyumludur.¹⁴

Alippi ve arkadaşları çalışmalarında; gelişimin erken evrelerindeki sıçanlarda kronik hipobarik hipoksinin gelişmeye olan etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada hipobarik hipoksiye etkin kalan sıçanlarda vücut ağırlığında ve kuyruk uzunluğunda artış saptanmıştır. Besin alımı ise deniz seviyesi koşullarında bulunan kontrol grubuna karşın önemli derecede az bulunmuştur. Sonuç olarak hipobarik hipoksinin sıçanlarda iştah ve besin alımının azalması nedeniyle gelişme geriliğine neden olduğu belirtilmiştir.¹³

Yüksek irtifada hipoksi, üreme sağlığını etkilemekte ve erkekfertilitesinde olumsuz sonuçlar ortaya çıkmaktadır.^{18,19,20} Yüksek irtifada çalışan kişilerin çoğalması ile hipobarik hipoksinin spermatogenezis üzerine etkilerinin incelendiği çalışmaların sayısı son yıllarda artmıştır ve tüm bu çalışmalarda hipoksinin neden olduğu mekanizma değişiklikleri ortaya konulmaya çalışılmıştır.⁹

Walton ve Uruski çalışmalarında, düşük atmosfer basıncının erkek tavşanlarda üremeye etkilerini incelemişlerdir. Bu erekle tavşanları çeşitli atmosfer basınçlarında değişik sürelerde bırakmışlardır. Araştırmacılar sonuç olarak düşük atmosfer basıncının erkek tavşanlarda üremeyi olumsuz etkilediğini belirtmişlerdir.⁸⁴

Nakanishi ve arkadaşları 5500 m yüksekliğe eşdeğer koşulda hipobarik hipoksinin antioksidan enzimlere olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, mitokondriyal süperoksid dismutaz enziminin sıçan karaciğer ve akciğerlerinde önemli ölçüde azaldıklarını saptamışlardır.⁸⁵

Okumura ve arkadaşları dağda yaşayarak yüksek irtifaya etkin kalan erkeklerin genital sistemlerinde olaylanan değişimleri inceledikleri çalışmalarında denekleri üç gruba ayırmışlardır. Buna göre, 5100 metre yükseklikte 21-24 gün ve ardından 6700 metre yükseklikte 4-5 gün yaşayan deneklerin bu yükseklikten inmesini izleyen 1. ay, 3. ay ve 2. yıllarda semen örnekleri alınmış ve endokrinolojik testler uygulanmıştır. Sonuçta her üç grubun da semen hacminde değişiklik görülmemiştir. 1 ay sonra alınan semen örneğinde sperm sayısında azalma olduğu belirlenmiş ve 3 ay sonra alınan örnekte de bu azalmanın düzelmediği izlenmiştir. 2 yıl sonra alınan semen örneğinde ise sperm sayısının ilk düzeyine ulaştığı

saptanmıştır. Benzer şekilde 1 ay sonra alınan örneklerde anormal şekilli sperm sayısında artış görülmüş ancak 3 ay sonra yapılan testlerde bu durumun normale dönmeye başladığı dikkati çekmiştir. Ayrıca 1. ay sonunda yapılan kan testleri sonucu kan testosteron düzeylerinde belirgin bir azalma görülürken, 3. ay sonunda artmaya başladığı ve 2. yıl sonunda da tamamen normale döndüğü izlenmiştir. Çalışmanın sonucunda araştırmacılar, yüksek irtifanın erkeklerin spermatogenik hücrelerinde ve Leydig hücrelerinde geri dönüşümlü işlev bozukluğuna neden olduğunu bildirmişlerdir.⁸⁶

Gasco ve arkadaşları; yüksek irtifanın sıçanlarda spermatogenezise ve epididimal sperm sayısına etkilerini araştırmışlardır. Bu erekle 3 aylık erkek Holtzman sıçanları Peru' da 4340 m'de 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42 gün boyunca hipoksiye etkin bırakılırken, kontrol grubu aynı sürelerde deniz düzeyinde tutulmuştur. Yüksek irtifadaki sıçanlarda spermatogenezis aşamaları incelendiğinde, süreye koşut spermatogenezisin mitoz ve mayoz bölünme evrelerinde inhibisyon belirlenmiştir. Sonuçta epididimal sperm sayısının azaldığı vurgulanmıştır.⁸⁷

Farias ve arkadaşları; kronik hipobarik hipoksi ve aralıklı hipoksinin testis histolojisinde ve yuvarlak spermatidlerin oksidatif metabolizmaları üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla erkek Wistar sıçanlar, normoksi grubu (deniz düzeyi koşullarında), kronik hipobarik hipoksi grubu ve aralıklı hipoksi grubu olarak üç gruba ayrılmıştır. Aralıklı hipobarik hipoksi grubu, 96 saat süresince 4600 m'deki basınç koşulları sağlanan hipobarik hipoksiye, bunu izleyen 96 saat süresince normobarik koşullara 60 gün etkin bırakılmıştır. Kronik hipobarik hipoksi grubu ise 4600 m'deki basınç koşulları sağlanan hipobarik hipoksiye, ancak her 96

saatte bir normobarik koşullara alınıp yaklaşık 2 saat sonra yeniden hipobarik hipoksiye toplam 60 gün boyunca etkin bırakılmıştır. Kronik hipobarik hipoksi ve aralıklı hipoksi gruplarında; testiküler ağırlıkta belirgin düşüş, intersitisyel alanlarda artma, seminifer epitel kalınlığında azalma, epitel hücrelerinde vakuolizasyon ve bazal membranda katlanmalar görölmüşür. Sonuç olarak kronik hipobarik hipoksi ve aralıklı hipoksinin, sıçanlarda testis yapısında değişimlere ve spermatogenik hücrelerin yitimi ile hasara neden olduğu belirtilmiştir.²⁰

Çalışmamızda oluşturduğumuz kronik hipobarik hipoksi modelinde testis dokusunda ince yapı düzeyinde yaptığımız değerlendirmemizde; spermatogenik seriyi oluşturan hücrelerin sitoplazmasında vakuolizasyon görölürken bazal lamina normal yapıda izlendi. İnterstisyel alandaki Leydig hücrelerinde sitoplazmada vakuolizasyonun yanı sıra yoğun öz bölgesi içeren lipid damlacıkları dikkat çekiciydi. Antioksidan uygulaması yapılan deney gruplarında ise spermatogenik seriyi oluşturan hücrelerdeki vakuol oluşumunun azaldığı ve ince yapı düzeyinde hücrelerin kontrol grubuna benzerlik gösterdiği ilgiyi çekti.

Verratti ve arkadaşları; kronik hipoksinin insan sperm değerlerine etkilerini ve bu etkilerin düzelme süresini incelemek amacı ile altı sağlıklı dağcının sperm parametrelerini normoksi koşullarında deniz düzeyinde değerlendirmişlerdir. Dağcılar 26 gün yüksek irtifaya etkin kaldıktan sonra (5600 m) aynı sperm değerleri, deniz düzeyi koşullarına döndükten sonra, bundan 1 ay ve 6 ay sonra yeniden incelenmiştir. Yüksek irtifadan döndükten hemen sonra sperm sayısında azalma belirlenmiş, ancak sperm hareketliliğinde düşüş görölmemiştir. Yüksek irtifadan döndükten 1 ay sonra incelenen değerlerde sperm

hareketliliğinde azalma izlenirken, 6 ay sonra hipoksi etkisi öncesi bulgulara dönüş saptanmıştır. Anormal veya hareketsiz sperm sayısı yüksek irtifadan döndükten hemen sonra ve 1 ay sonra artmışken, 6 ay sonra tamamen düzelerek hipoksi öncesi değerler elde edilmiştir. Ejekulatta toplam hareketli sperm sayısı yüksek irtifadan döndükten hemen sonra ve 1 ay sonra azalmıştır. 6 ay sonra ise normal değerlere ulaşılmıştır. Araştırmacılar sonuç olarak; kronik hipoksinin, sperm hareketinde azalma ile birlikte oligospermiyi uyardığını ve sperm değerlerinin 6 ay sonra oksijen alımının etkisi ile normal değerlerine ulaştığını belirtmişlerdir.¹⁹

Farias ve arkadaşları bir diğer çalışmalarında; kronik hipobarik hipoksiye koşturularak testiküler sıcaklık ve damarlanmadaki değişimleri araştırmışlardır. 10 haftalık erkek Wistar sıçanlar, normoksi grubu (deniz düzeyi koşullarında) ve 4600 m'deki basınç koşulları sağlanan kronik hipobarik hipoksi grubu olarak iki gruba ayrılmıştır. Kronik hipobarik hipoksi grubu 0, 5, 15, 30 günlük periyodlarla hipoksiye etkin kalmıştır. Buna göre, hipoksi ile vücut ve testis ağırlıklarının azaldığı, seminifer tübülde epitelin kalınlığının önemli derecede azaldığı ve spermatogenezin azaldığı görülmüştür. İntersitisyel alandaki kan damarları sayısının büyük ölçüde arttığı, kanın vizkozitesinin arttığı ve testiküler sıcaklığın 1,5 °C kadar arttığı belirtilmiştir. Araştırmacılara göre, hipobarik hipoksi kanda ve damarlanmada oluşan değişiklikler sonucu testis sıcaklığındaki artış ile spermatogenezisi azaltmaktadır.⁸⁸

Hipoksik koşulların neovaskülerizasyon sonucu testis sıcaklığını arttırdığını savunan deneysel bir çalışmada da Bustos-Obregon ve arkadaşları; kronik hipobarik hipoksinin spermatogenezise etkilerini araştırmışlardır. Sexuel olgunluğa ulaşmış fareler kontrol grubu (deniz

seviyesinden 540 m yükseklikte) ve kronik hipobarik hipoksi grubu (4600 m) olmak üzere 2 gruba ayrılmış ve 8, 16, 24, 33 gün boyunca bu koşullara etkin bırakılmıştır. Deneylerin sonucunda, testis, epididimis ve seminal vezikül ağırlıkları azalmıştır, ancak bu azalma 33. günde tekrar düzelmeye başlamıştır. Spermiyum ve testiküler parankimde lipoperoksidasyon seviyesi azalmıştır. Sperm sayısı ve morfolojisi hipoksiye etkin kalma süresine göre değişmiştir. Testislerde hücrelerde dökülme, seminifer tübül lümeninde tıkanma, seminifer tübüllerin çapında ve boyunda azalma, germinal epitelde düzensizlik, vakualizasyon ve hücre kaybı, intersitisyel alanlarda artış, neovaskülogenez, vasodilatasyon gözlenmiştir. Ancak belirgin bir apoptotik element görülmemiştir. Araştırmacılar üremedeki bu parametrelere göre, fare fertilitesinde azalma olabileceğini belirtmişler ve özellikle ateriollerdeki vasodilatasyon ve neoanjiyogenezin testiküler sıcaklığı arttırarak spermatogenezise zarar verebileceğini açıklamışlardır.⁹

Bizim çalışmamızda da gebelik döneminde hipoksiye etkin kalan annelerin yavrularında, postnatal 14. günde neovaskülerizasyonun varlığı ve 21. günde de devam ettiği belirgin olarak izlendi. Ayrıca spermatogenik serideki dağılımın aynı günde 7. gün gruplarına benzer görünümde oldukları izlenirken, bu bulgunun olası testis sıcaklık artışında üremenin olumsuz etkilenmesinin bir sonucu olaylanmış olabileceği kanısına varıldı.

Gosney; hipobarik hipoksinin Leydig hücre topluluğuna etkilerini araştırmıştır. Buna göre 10 erişkin genç erkek Wistar albino sıçan 28 gün süresince 380 mmHg basınçta hipobarik hipoksiye etkin bırakılmıştır. Sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; hipobarik hipoksinin testiküler hacim ve ağırlıkta azalmaya, seminifer tübül epitelinde

değişikliklere (seminifer epitelde yozlaşmalar ve nekrotik alanlar), spermatogenik hücrelerde dejenerasyona ve Leydig hücrelerinin kapladığı hacimde azalmaya neden olduğu görülmüştür.²¹

Fahim ve arkadaşları yüksek irtifada akut ve kronik etkilerin testosteron düzeyine ve erkek üreme sistemine olan etkilerini inceledikleri çalışmada; seksüel olgunluktaki sıçanları iki gruba ayırmışlardır. Akut olarak etkilenen grup 6000 m yüksekliğe beş kez, kronik olarak etkilenen grup yine aynı yüksekliğe 70 kez etkin bırakılmıştır. Akut grupta testislerde ya da plazma testosteron düzeyinde bir değişiklik görülmezken; kronik grupta plazma testosteron düzeyinde büyük ölçüde azalma, seminifer tübül çaplarında azalma, spermatogenik hücrelerde dejenerasyon ve spermatogenik dokunun %80'inde vakualizasyon, intersitisyel dokuda daha az vakualizasyon, intesitisyal doku hücreleri çekirdeklerinde piknoz, intersitisyel alanda kan damarlarının genişlemesiyle hiperemi gözlenmiştir.⁸⁹

Liu ve Du; kronik hipoksinin doğum sonrası testis gelişimine etkilerini araştırmışlardır. Wistar cinsi sıçanları doğumlarından itibaren 45 gün süre ile 5000 m basınç koşullarındaki hipoksiye etkin bırakmışlardır ve doğum sonrası 3, 7, 14, 21, 28, 35 ve 45. günlerde testis dokuları incelemişlerdir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hipoksik sıçanlarda 3. gün dışındaki tüm yaş gruplarında vücut ve testis ağırlıklarının önemli ölçüde düşük olduğunu bildirmişlerdir.¹⁸ Hipoksi süresince vücut gelişiminin engellenmesinin büyük olasılıkla hipoksi ile uyarılan endokrin yetersizlikle ilgili olduğunu (özellikle hipotiroidizm) düşünmüşlerdir.^{18,90,91} Ayrıca, büyüme hormonu da hipoksiden etkilenmektedir.⁹⁰ Yetişkin sıçanlarda kronik hipoksinin hipofiz bezi ve plazmada büyüme hormonu düzeyini azalttığı araştırmacıların daha önceki araştırmalarında da

belirtilmiştir. Hipoksi grubunda plazma testosteron düzeyi doğum sonrası 7, 14, 21. günlerde belirgin şekilde yüksektir, ancak doğum sonrası 21. gün sonrasında ani bir düşüş görülmüştür. Testosteron salınımı postnatal 3. günde ise engellenmiştir. Kontrol grubunda plazma testosteron düzeyi postnatal 7, 14, 21. ve 28. günlerde düşük kalmış, 28. günden sonra artmıştır. Araştırmacılar iki grup arasındaki testosteron düzeylerindeki bu farklılığı, neonatal gelişimin kritik bir evresinde hipoksinin erişkin tip Leydig hücrelerinin farklılaşmasını durdurması nedeniyle olabileceğini belirtmişlerdir. Hipoksik sıçanların testisleri histolojik olarak incelendiğinde ise, en erken doğum sonrası 3. günde intersitisyel alanlarda artış gözlenmeye başlanmıştır, doğum sonrası 35. ve 45. günde ise intersitisyel alandaki artış kısmen düzelmekte ise de seminifer tübüller halen küçük boyutlardadır. İntersitisyel alandaki bu değişikliğin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bu değişiklikler hipoksinin kan-testis bariyerinin işlevini azaltmasına, bozulmasına ve Sertoli hücrelerinden aktif maddelerin taşınımını uyarması ile ilişkili olabilir. Doğum sonrası 14. günden sonra testiste damarlanmalarda artış, 14 ve 21. günlerde Leydig hücrelerinin lipid damlacıkları içerdikleri görülmüştür. Araştırmacılar damarlanmadaki artışı, Sertoli hücrelerinden VEGF (Vasküler endotelyal büyüme faktörü) salınımı artışına bağlamışlardır. Damarlanmadaki artışın ise testise oksijen sağlanmasını artırıyor olabileceğini ve dokunun böylece hipoksiye bir uyum göstermiş olabileceğini belirtmişlerdir. Doğum sonrası 21 ve 28. günlerde spermatogenik hücrelerde ve Leydig hücrelerinde kristalleri bozulmuş, genişlemiş, şekilsiz birçok mitokondriyon belirlenmiştir.¹⁸

Lipid damlacıkları steroid hormonların öncülü olan hücresel birikimlerdir. Bizim çalışmamızda yapılan elektron mikroskopik incelemelerde kontrol gruplarında Leydig hücrelerinde birbirine uyumlu oranda lipid damlacıkları izlenirken, artan günlere koşut lipid damlacıklarının arttığı görülmüştür. Bu bulgu artan güne koşut testiste

testosteron salınımının arttığı şeklinde yorumlanmıştır. Hipoksik gruplarda ise Leydig hücrelerinde özellikle 14. günden itibaren artan ve birbirleri ile birleşen lipid damlacıklarının bulunması, literatür ile uyumlu olarak hipoksideki neovaskülerizasyonun olaylanması sonucu hücre aktivitesindeki artışın bir sonucu olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda spermatogenik seri ve Leydig hücrelerine ait mitokondriyonlar değerlendirildiğinde, hipoksik gruplarda yaygın kristolizis gözlenmiş, kristolizisin hücrelerde olaylanan oksidatif stresin göstergesi olarak enerji metabolizmasındaki değişim sonucu gerçekleşmiş olabileceği kanısına varılmıştır.

Yapılan diğer çalışmalarda da başka araştırmacılar, hipoksinin tavukların Sertoli hücrelerinde, sıçanların böbrek üstü bezi zona glomeruloza katman hücrelerinde, glomerulus, kornea epitel, beyin korteksi ve diğer bazı doku hücrelerinde mitokondriyonların genişlemesini uyardığını bildirmişlerdir. Bunun yanında, mitokondriyonlardaki hasar, hücre hasarı ve apoptozisle ilişkilidir. Böylece hipoksinin testiste intersitisyel alanların artışı ve mitokondriyonların genişlemesini içeren yapısal değişiklikleri uyardığı bulunmuştur. Doğum sonrası 28. günden sonra testiste histolojik hasar ve yıkım kısmen düzelmiştir, ancak testis gelişimi ve endokrin işlevi gerçekte normale dönmemektedir. Bunun nedeni doğumu izleyen 28. gün sonrası, testis ağırlıkları normal ölçüsüne geri dönememesi ve puberte öncesi testosteron düzeyinin bulunmamasıdır. Bunun yanında hipoksi süresince, doğum sonrası yaşamda sıçanların testis gelişimi için araştırmacılarca tanımlanan kritik evre çok önemlidir. Bu evre araştırmacılara göre büyük olasılıkla doğumdan sonraki ilk dört haftadır. Bu durum araştırmacıların, sıçanlarda hipoksi süresince hipofiz bezinin gelişimi için doğum sonrası 25-28. günlerin çok önemli olduğu bulgularıyla uyumludur. Sonuç olarak kronik hipoksi sıçan testislerinde doğum sonrası testis gelişiminde gerilemeye

neden olmaktadır. Bu gerilemenin nedenleri; vücut gelişiminin baskılanması, testis endokrin işlevinin değişmesi ve testiste yapısal değişikliklerin oluşmasıdır.¹⁸

Apoptozis terimi ilk olarak 1972 de J.F.K. Kerr tarafından nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli için tanımlanmıştır ve fizyolojik hücre ölümünü ifade eder. Teorik olarak apoptozis, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisince programlanmış bir düzenek yolu ile hücre ölümünü denetleyen aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı veya programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanabilir. Hücrede apoptozisi belirlemek için kullanılan birçok yöntem vardır.⁹² Apoptozis sonucu oluşan DNA kırıkları, DNA'nın serbest 3'OH kısmının modifiye edilmiş nükleotidlerle işaretlenmesi ile belirlenebilir.⁹³ TUNEL yöntemi (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling) de histokimyasal olarak apoptozisi gösteren bu yöntemlerden biridir.^{92,93} TUNEL yönteminde apoptotik hücrelerle birlikte nekrotik hücreler de belirlenebilirken, bu yöntem daha çok apoptozis için özgün olup, özellikle apoptozisin erken aşamalarındaki hücreleri göstermesi açısından özel ve önemli bir yöntemdir.⁹³

Liao ve arkadaşları; hipobarik hipoksinin erkek sıçanların üreme hücrelerinde apoptozis üzerine etkilerini araştırmışlardır. Erişkin Wistar sıçanları; kontrol grubu, 5 gün süresince hipoksiye etkin kalanlar, 15 gün süresince hipoksiye etkin kalanlar, 30 gün süresince hipoksiye etkin kalanlar olarak dört gruba ayırmışlardır ve hipoksiyi 5000 m yükseklikteki basınç koşullarını sağlayarak hipobarik kamerada gerçekleştirmişlerdir. Testis üreme hücrelerinde apoptozisi belirlemek için flow sitometri ve TUNEL yöntemi kullanmışlardır. Bax ve Bcl-2 genleri ise Western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Hipoksi gruplarında seminifer

tübüllerdeki apoptotik üreme hücreleri kontrol grubundan önemli ölçüde fazla bulunmuştur. Apoptotik hücrelerin çoğu spermatogonyum ve spermatositlerdir. Flow sitometri ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, 15 ve 30 günlük hipoksik gruplarda apoptotik üreme hücreleri büyük oranda artmıştır. Bax geni önemli ölçüde yüksektir ve dolayısıyla Bax/Bcl-2 oranı da 30 günlük hipoksik grupta yüksektir. Araştırmacılar bu sonuçlar doğrultusunda, kronik hipoksinin erkek sıçanların üreme hücrelerinde apoptozisi ve sıçan testisinde Bax geni ekspresyonu arttırdığını belirtmişlerdir.⁹⁶

Bax / Bcl genleri mitokondriyal apoptozisin işaretleyicileridir. Bizim çalışmamızda gözlemlediğimiz mitokondriyal kristolizisin Liao'nun bulgularına koşut, mitokondriyal yolak ile apoptozisin indüklenmiş olabileceği sonucunu doğurmaktadır. Nitekim, bulgularımızı desteklemek adına yaptığımız ve hücrelerdeki DNA kırıklarının gösterilmesi olan TUNEL boyama yönteminde de gerek spermatogonyum, gerekse spermatositlerde hipoksi gruplarında belirgin apoptozis belirlenmiştir.

PCNA (çoğalan hücre çekirdek antijeni), hücre döngüsünün işleyişinin düzenlenmesinde önemli role sahip olan, hücrede çekirdek matriksinde eksprese edilen 36 kDa'luk, asidik bir çekirdek polipeptiddir.^{97,98, 99} PCNA ilk olarak hücre döngüsünün sadece S fazında tanımlanırken, daha sonra DNA hasarının onarımında ve DNA replikasyonunda DNA polimeraz delta'ya yardımcı (ko-faktör) olarak görev aldığı belirtilmiştir.¹⁰⁰ Hücre döngüsünün G1 evresinde PCNA ekspresyonu artmaya başlar, S fazı süresince en yüksek düzeye ulaşır, G2 evresinde ekspresyonu azalmaya başlar, M fazında ve interfazda ise en düşük düzeye ulaşır.⁹⁷ PCNA normal dokularda hücre çoğalmasını belirlemek için kullanılmaktadır.¹⁰¹

Testiste PCNA tutulumu, seminifer epitel duvarında spermatogonyum ve primer spermatositlerde görülmektedir.¹⁰² PCNA, kuvvetli tutulumu ile erkek infertilitesinde testiste spermatogenik işlevin ve üreme hücreleri kinetiğinin değerlendirilmesinde önemli bir moleküler işaretleyicidir.¹⁰³ PC10 monoklonal antikoru, Waseem ve Lane tarafından 1990 yılında PCNA'a karşı olarak geliştirilip karakterize edilmiştir.^{98,99,104} Tutulumu doğrudan proliferasyon aşamasında olan hücrelerde görülmektedir.^{98,99} PCNA yaygın bir şekilde pek çok türde, özellikle insanlarda ve sıçanlarda spermatogonyumların ve spermatositlerin çoğalmasının belirlenmesinde kullanılmaktadır.^{98,105} Ayrıca erkek farelerde üreme hücrelerinin gelişiminin değerlendirilmesinde olduğu gibi, sıçan testisinde embriyonik ve doğum sonrası gelişim süresince hücre çoğalmasını belirlemek için kullanılmaktadır.^{98,106}

Angelopoulou ve arkadaşları çalışmalarında, Wistar sıçan embriyolarında (14.5, 18.5, 20.5 günler) ve neonatal Wistar sıçanlarda (0., 1., 3., 5., 7. günler) testiküler organogenezis süresince üreme hücrelerini PCNA ve Ki67 antikoru ile değerlendirmiştir. 2 antikoruyla işaretleme sonucu fetal dönemde 14. gün ile doğum sonrası 0. gün arasında testiste üreme hücreleri sayısında artış görülmüştür. Doğum sonrası ilk üç günde üreme hücrelerinde belirgin bir azalma görülürken, doğum sonrası 3-5. günler arasında da mitoz erkinin sürdüğü izlenmiştir. Bunu izleyen günlerde ise hücre çoğalmasının azaldığı bildirilmiştir. Ancak bu evrede PCNA ve Ki67 antikoru ile işaretleme büyük ölçüde farklılıklar göstermiştir.⁹⁸

Steger ve arkadaşları; insan testis biyopsi örneklerinde seminifer tübül epitellerinde Ki67 ve PCNA antikorunun dağılımını

incelemişlerdir. Obstruktif azospermili hastaların normal seminifer tübül epitellerinde Ki67 antikoru sadece spermatogonyumlarda belirlenirken, PCNA antikoru spermatogonyumlarda ve primer spermatositlerde saptanmıştır. Farklı tip spermatogonyumlar karşılaştırıldığında Ki67 ve PCNA ile en yoğun işaretlenme tip B spermatogonyumunda gözlenmiştir. Oligozoospermik erkeklerden alınan biyopsi örnekleri normal testis ile karşılaştırılmış ve spermatogonyumların immünpozitifliğinde önemli oranda azalma olduğu belirtilmiştir.¹⁰⁵

Bernal-Manas ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, puberte sonrası tek ve çift taraflı kriptorşidizmlı yaban domuzlarının ve sağlıklı yaban domuzlarının testislerinde proliferasyon ve apoptozisi incelemişlerdir. Üreme hücrelerinde proliferasyon PCNA antikoru ile immünohistokimyasal yöntemlerle, apoptozis TUNEL yöntemi ile değerlendirilmiştir. İncelemelerde kriptorşid testislerde seminifer tübül kalınlığının azaldığı görülmüştür. Sağlıklı yaban domuzlarında çok sayıda spermatogonyum çoğalma gösterirken, kriptorşid testiste çoğalmanın az olduğu ve çoğalma/apoptozis oranının düşük olduğu gözlenmiştir. Sağlıklı yaban domuzlarında TUNEL (+) üreme hücrelerinin mayoz bölünmenin farklı evrelerindeki spermatogonyumlar ve spermatidler olduğu görülürken, kriptorşid testislerde TUNEL (+) üreme hücrelerinin sadece spermatogonyumlar olduğu izlenmiştir. Araştırmacılar apoptozis göstergesinin kriptorşid ve sağlıklı testislerde benzer olduğunu ve sonuç olarak kriptorşid testislerde spermatogonyumların çoğalmasının düşük oranda olduğunu belirtmişlerdir.¹⁰⁷

Koh ve Kim yaptıkları çalışmada, kronik etanole etkin kalan erkek sıçanlarda testiste hücrelerin çoğalma erkini ve apoptozisi PCNA ve TUNEL yöntemlerini kullanarak araştırmışlardır. Sonuç olarak, testislerde

etanol uygulanan grupta spermatogonyum ve primer spermatositlerdeki PCNA (+) hücre sayısının azaldığını ve TUNEL yöntemi ile incelediklerinde etanol uygulanan grupta apoptozise giden hücre sayısında artışın olaylandığını belirlemişlerdir.¹⁰²

Çalışmamızda kronik hipobarik hipoksinin testiste hücre çoğalmasına etkisini değerlendirmek amacıyla yaptığımız PCNA boyamalarında PCNA (+) hücreler spermatogenik seri hücreleri ve Leydig hücreleri olarak saptanmış olup, doğum sonrası artan günlere koşut spermatogonyumlara ek olarak spermatositlerde de tutulum gözlenmiştir. Genel olarak tutulumun hipoksik gruplarda daha az sayıda hücrede varlığı saptanmış olup, hipoksinin hücre bölünmesini olumsuz etkilediği kanısına varılmıştır. Proliferasyonun spermatogenik epitel kalınlığına etkisini değerlendirmek amacıyla yaptığımız ölçümler sonucunda da, immünohistokimyasal bulgularla uyumlu olarak, hipoksik gruplardaki epitel kalınlığının kontrol grubuna göre az olduğu istatistiksel değerlendirmeler ile anlamlı bulunmuştur.

Serbest radikaller hücrede, hücre membran lipidleri ve hücre organellerinin, proteinlerin ve DNA yıkımına ve DNA da mutasyonlara, enzim aktivitelerinde değişikliklere neden olmaktadır. Hücrelerde serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu oksidan yıkıma karşı antioksidanlar olarak isimlendirilen birçok koruyucu bulunmaktadır. Normalde oksidatif olaylara karşı bu korunma düzenekleri olmasına karşın endojen süperoksit radikal yapımında artış, radikallere karşı savunmalarda eksiklik olması durumunda dokuda artmış oksidatif yıkım görülebilir.^{94,95}

Hipoksi sonucu oluşan olumsuz etkileri önlemek için birçok antioksidan kullanılmaktadır.^{22,23} Ginkgo biloba da bu antioksidanlardan biridir ve serbest radikallerin hasarını engeller, PAF üzerine karşıt etki gösterir.^{24,26}

Sarada ve arkadaşları; hipoksi sonucu ortaya çıkan oksidatif stres üzerine beta-karoten'in antioksidan etkisini erkek sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışma ile araştırmışlardır. Denekler üç gruba ayrılmış; ilk grup kontrol grubu, ikinci grup hipoksik stres uygulanan grup ve son grup da hipoksik stres ve ardından 10 mg/kg oranında beta-karoten uygulanan grup olarak belirlenmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda hipoksik stres uygulanan ikinci grupta plazma ve dokuda malondialdehit yoğunluğunda ayrıca kanda kırmızı ve beyaz kan hücrelerinde artış görölmüştür. Bunun yanı sıra kan glutatyon, glutatyon peroksidaz ve plazma protein, plazma beta-karoten yoğunluklarında ise azalma olduğu belirlenmiştir. Antioksidan etkisi bilinen beta-karoten uygulanan son grupta yapılan ölçümlerde ise bu verilerin tam aksi yönde değişim gösterdiği; malondialdehit'de azalma, glutatyon, glutatyon peroksidaz, plazma protein ve beta-karoten düzeylerinde artış olduğu görölmüştür. Bu veriler ışığında, beta-karoten'in hipoksi üzerinde antioksidan etki gösterdiği sonucuna varılmıştır.¹⁰⁸

Ilavazhagan ve arkadaşları çalışmalarında, sıçanların 7576 m yüksekliğe etkin bırakılmasından beş gün önce vitamin E uygulanması ile hücrelerde yüksek irtifanın yol ağtığı lipid peroksidasyon artışının önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir.¹⁰⁹

Ginkgo biloba tohum ve yaprakları pek çok sağlık sorununun tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır. Alzheimer hastalığı, demans, zayıf serebral yada oküler kan akımı, anksiyete, depresyon, menstruasyon öncesi sendrom ve yüksek irtifa hastalıkları Ginkgo biloba ile tedavi edilen sağlık sorunlarından bir kısmıdır.^{110,111,112,113} Saflaştırılmış Ginkgo biloba ekstraktları, tüm dünyada Rokan, Tanakan, Tebonin, Ginkold gibi isimlerle satılmaktadır ve çok yaygındır. Bu ekstraktlar, özellikle Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri' nde popüler olarak kullanılmaktadır.¹¹⁴

Hıbatallah ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, serbest radikallerin pek çok deri hastalığında varlığını belirtmişler ve %33 Ginkgo flavon glikozitleri, daha çok kuersetin ve kaempferol içeren Ginkgo biloba ekstraktının deride serbest radikal etkisini azaltıcı erkini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda, bu Ginkgo biloba ekstraktının deride serbest radikalleri önlemede yararlı etkileri olduğu dűřüncesine varmışlardır.¹¹⁵

Nishida ve Satoh; Ginkgo biloba ekstraktını oluşturan terpenoidler (bilobalid, ginkgolid A, B ve C) ve flavonoidlerin (kuersetin ve rutin) vasodilatasyondaki etkilerini araştırmışlar ve ekstraktın tüm bileşenlerinin yoğunluğuna bağlı olarak az ya da çok vasodilatasyonu etkilediklerini belirtmişlerdir.¹¹⁶

Yao ve arkadaşları; sıçanlarda etanol ile uyarılmış oksidatif strete Ginkgo biloba'nın karaciğer, kalp, bűbrek ve testis dokularında koruyucu etkilerini antioksidatif değerler ve lipid peroksidasyonunun belirlenmesi ile araştırmışlardır. Etanol ile oluşturulan oksidatif stres sonucu tüm dokularda, hűcre içinde bol bulunan ve serbest radikallere

karşı koruyucu glutatyon düzeyinde azalma, lipid peroksidasyonunu belirlemek için ölçülen malondialdehit düzeyinde artma, hücrelerde bulunan antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz düzeylerinde ise azalma görülmüştür (böbrekte süperoksitdismutaz, kalpte katalaz dışında). Etanol ile uyarılmış oksidatif stres oluşturulan sıçanlara Ginkgo biloba ekstraktı verildiğinde ise; glutatyon düzeyinde artma, malondialdehit düzeyinde azalma, antioksidan enzimlerin düzeylerinde ise artma gerçekleşmiştir. Araştırmacılar bu sonuçlarla, Ginkgo biloba ekstraktının pek çok dokuyu, etanol ile uyarılmış oksidatif stresin etkilerinden koruyabileceğini belirtmişlerdir.¹¹⁷

Sastre ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Ginkgo biloba ekstraktının (EGb 761) oksidatif strese karşı koruyucu etkisini araştırmışlardır. Buna göre, yaşlı sıçanların beyin ve karaciğerinden alınan örneklerdeki mitokondriyon yapısı ve mitokondriyonal DNA, genç sıçanlardakilerle karşılaştırılmıştır. Mitokondriyondaki peroksid oluşumunun yaşlı sıçanlarda gençlere karşı daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu nedenle benzer şekilde, mitokondriyonal DNA'daki oksidatif hasar yine daha fazladır. Çalışmada ayrıca mitokondriyonların iki farklı yapıda olduğu belirtilmiştir; bir grup mitokondriyon büyük ve karmaşık yapıdadır ve yaşlı sıçanlarda daha fazla görülür, bir grup mitokondriyon ise küçük ve daha az karmaşık yapıdadır ve genç sıçanlarda daha fazla izlenir. Çalışmaya göre Ginkgo biloba ekstraktı, oksidatif strese bağlı mitokondriyonal yaşlanmayı önlemektedir. Deneylerde, uygulanan Ginkgo biloba ekstraktının yaşlı sıçanlarda görülen bu mitokondriyon yapısında bir miktar düzelmeye yol açtığı ve peroksid miktarında da azalmanın olduğu belirlenmiştir.¹¹⁸

Gertsch ve arkadaşları ise; Ginkgo biloba'nın yüksek irtifa hipoksisi üzerindeki antioksidan etkisini araştırmışlardır. Çalışmada verilen bilgilere göre yüksek irtifa hipoksisi (hipobarik=hipoksik hipoksi) serebrovasküler (örneğin kan-beyin bariyeri) yapılarda endotelial hücre hasarına yol açmaktadır. Akut dağ hastalığı adı verilen rahatsızlıkta da kan-beyin bariyerinde hasar oluşmaktadır. Bu çalışmada, hastalığa neden olacak koşullar uygulanmadan bir gün önce denekler üzerinde kullanılan Ginkgo biloba preparatlarının, hastalığın oluşumu ile oluşan etkiler üzerinde azalmaya yol açtığı görülmüştür. Bunun esas nedeninin ise; uygulanan bu antioksidanın, serbest radikallerin yol açtığı oksidatif hasarı mitokondriyal ATP sentezi ve lipid membran bütünlüğü üzerine etki ederek engellemesi olduğu belirtilmiştir.¹¹⁹

Guinot ve arkadaşları, sağlıklı erkek dağcılarda PAF ile uyarılmış trombosit agregasyonunun Ginkgo biloba ekstraktı olarak satılan Tanakan ile önlenip önlenemeyeceğini araştırmak için bu konuda çalışma yapmışlardır. Tanakan'ın sağlıklı dağcılarda ex vivo olarak adrenalin, adenosin difosfat (ADP), kollajen ya da PAF ile uyarılan trombosit agregasyonuna etkilerini belirlemek için tek doz 15 ml Tanakan verilmiştir. Tanakan alınımından 1 saat önce ve 2, 4, 8 saat sonra kanları alınarak agregasyon ölçülmüştür. Tanakan trombosit agregasyonunu azaltmıştır ve bu sonuç Tanakan'ın periferik vasküler hastalıkların tedavisinin kullanımında klinik etkisini açıklamaktadır.¹²⁰

Al-Yahya ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; Ginkgo biloba'nın Swiss albino sıçanların üremesine sitolojik ve toksikolojik etkilerini araştırmışlardır. Sıcaklık, nem, ışık, su alımı ve diet yönünden normal koşullarda olan 6-8 haftalık erkek sıçanlara 90 gün süresince günde 25, 50, 100mg/kg olarak farklı dozlarda Ginkgo biloba verilmiştir ve

üreme organlarının ağırlığı, sperm yapısı ve hareketliliği, testis kromozomları ve proteinleri incelenmiştir. Ginkgo biloba uygulanan erkek sıçanlar normal dişi sıçanlarla çiftleştirilmiştir ve bu erkeklerin üreme oranı, dişilerde gebeliği sağlaması, implantasyon öncesi kayıplar incelenmiştir. Sonuç olarak, Ginkgo biloba uygulaması ile erkeklerde epididimis kuyruğunda ve prostatta ağırlık azalması görüldüğü, sperm yapısında ve hareketliliğinde bir değişiklik olmadığı, testis kromozomlarında anomalilerin görüldüğü, testis proteinlerinin düzeylerinde değişikliklerin olduğu belirtilirken, Ginkgo biloba uygulanan erkek sıçanların dişilerde gebelik oranını düşürdüğü ve implantasyon öncesinde embriyonun kaybına neden olduğu belirtilmiştir. Bu toksisite, Ginkgo biloba'yı oluşturan toksik bileşenlerden (ginkgolik asit, biflavonlar, kardoller, kardoneller, bilobalidler, kuersetin) kaynaklanmaktadır. Bu veriler doğrultusunda araştırmacılar, Ginkgo biloba'nın erkeklerde iktidarsızlık ve erektil disfonksiyon tedavisi için çok dikkatli kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir.⁸²

Son yıllarda Ginkgo ürünlerinin kullanımında gerçekleşen bazı hemorajik durumlar bildirilmiştir. Koch, ginkolidlerle PAF inhibisyonu sağlanırken gerçekleşen trombosit agregasyonunda Ginkgo biloba ekstaktının etkilerini araştırmıştır ve PAF'ın birincil hemoraji oluşturacak kadar güçlü bir faktör olmadığını belirterek, ginkolidlerin PAF'e antagonistik etkilerinden dolayı EGb 761 kullanan hastalarda hemorajiden sorumlu olabileceği hakkında ciddi şüpheler uyandırdığını açıklamıştır.¹²¹

Pinto ve arkadaşları çalışmalarında, sıçanlarda prenatal evrede Ginkgo biloba kullanımının intrauterin gelişme geriliğine neden olup olmadığını araştırmışlardır. Gebeliğin 8.-20. günleri arasında vücut ağırlıklarına göre sıçanlara günde 0, 3, 5, 7 ve 14 mg/kg Ginkgo biloba verilmiştir. 21. gün sonunda gebe sıçanlar açılarak çeşitli parametrelerle

Ginkgo biloba etkileri incelenmiştir. Deneylerin sonucunda, Ginkgo biloba'ya ait maternal toksisite değerlerinde çok önemli değişikliklerin olmadığı, ancak günde 7 ve 14 mg/kg Ginkgo biloba verilen gebe sıçanlarda fötüs ağırlığında büyük ölçüde azalmalar olduğu görülmüştür. Bu verilere dayanarak araştırmacılar, Ginkgo biloba'nın anneye toksik etkisi olmadığını, ancak fetal intrauterin gelişim geriliğine neden olabileceğini bildirmişlerdir.¹²²

Testis torsiyonu, ender görülen ancak tedavi edilmediğinde fertilité açısından geriye dönüşümsüz değişikliklere yol açabilen acil ürolojik bir patolojidir. Orhan ve arkadaşları; sol testis torsiyonu sonrası karşı taraftaki testisteki iskemik hasarı önlemede Ginkgo biloba'nın etkinliğini araştırmışlardır. Çalışmada Sprague-Dawley cinsi erişkin erkek sıçanlardan 4 grup oluşturulmuştur. 1. grup, kontrol grubu, 2. grup Sham grubu, 3. grup 6 saat süreyle sol testis torsiyonu uygulanan grup, 4. grup, torsiyondan 30 dakika önce intramusküler 0.3 mg/kg dozunda EGb 761 uygulanan grup olarak belirlenmiştir. Testis dokuları makroskopik ve histopatolojik olarak incelendiğinde; ödem ve seminifer tübül çapları açısından 1., 2. ve 4. grup arasında anlamlı farklılık bulunmazken, 3. grup ödem ve seminifer tübül çapları tüm gruplardan anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Böylece testis torsiyonu sonrası karşı taraftaki testiste oluşacak iskemik hasarın, Ginkgo biloba ekstraktı EGb 761 ile büyük ölçüde azaltılabileceği belirtilmiştir.¹²³

Akgül ve arkadaşları; testiste iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesinde Ginkgo biloba'nın etkisini araştırmışlardır. Deneyde Wistar albino sıçanlardan 4 grup oluşturulmuştur. Birinci grup torsiyon/detorsiyon uygulanan grup, ikinci grup torsiyon/detorsiyon uygulanan sıçanlara 1 ay boyunca günde 50 mg Ginkgo biloba verilen grup, üçüncü grup 1 ay

boyunca Ginkgo biloba verilen sıçanlardan oluşan grup, dördüncü grup ise sham grubudur. Alınan testis dokuları biyokimyasal ve histolojik olarak incelendiğinde; testiküler nitrat, nitrit ve testiküler torsiyon sonrası peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehit düzeylerinin 1. grupta diğer gruplara karşın önemli ölçüde arttığı görülmüştür. 1. grupta seminifer tübüller arasında ödem, tıkanıklık ve hemoraji ağırlıklı olarak görülürken, 2. grupta histopatolojik hasar 1. gruba karşın belirgin şekilde azalmıştır. Bu nedenle Ginkgo biloba'nın testiste iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede koruyucu etkisi olduğu sonucuna varılmıştır.¹²⁴

Hipoksi sonrası Ginkgo biloba uygulamasının doğum sonrası günlere koşut etkisinin değerlendirildiği çalışmamızda, ince yapı düzeyindeki incelemeler ve TUNEL boyama yöntemlerinde hipoksinin neden olduğu olumsuz etkilerin Ginkgo biloba ile kısmen geri döndüğü saptanmıştır. Ancak yapılan istatistiksel ölçümler ile uyumlu olarak Ginkgo biloba'nın özellikle 21. günde kontrol grubuna benzer etkinlikte olduğu bulunmuştur. Bu bulgu, bir antioksidan olan Ginkgo biloba'nın uzun süreli kullanımda daha etkin olabileceği ve oksidatif hasarı ortadan kaldıracabileceği sonucunu doğurmuştur.

6. SONUÇ

Çalışmamızda gebeliğin kritik dönemlerinde hipobarik hipoksiye etkin kalan sıçanlardan elde edilen yavruların testis dokularındaki değişiklikler günlere koşut incelenmiş, ayrıca son yıllarda önemli bir antioksidan olarak kullanılan Ginkgo biloba'nın olası koruyucu etkileri araştırılmıştır.

Testis dokusunda hücre proliferasyonunu değerlendirmek amacıyla yaptığımız PCNA immün boyamasında; hipoksik gruplarda tutulumun kontrol grubuna karşın azaldığı, Ginkgo biloba uygulaması yapılan hipoksik gruplarda ise kontrole yakın tutulum olduğu saptanmıştır.

TUNEL yöntemi ile testiküler hücrelerde apoptozisi incelediğimiz boyamalarımızda da PCNA bulguları ile uyumlu sonuçlar elde edilmiş olup, hipoksinin hücre proliferasyonunu azalttığı, buna karşın apoptozisi göreceli indüklediği belirlenmiştir. Ginkgo biloba uygulamasının ise özellikle erişkinliğe yakın dönem olan 21. günde kontrole tamamen uyumlu koruyuculuk gösterdiği gözlenmiştir.

Çalışmamızda hipobarik hipoksi gruplarımızda ince yapı düzeyinde Leydig hücre sitoplazmasında vakuolizasyon, mitokondriyonlarında kristolizis ile birlikte yoğun öz bölgesi lipid damlacıkları izlenmiştir. Seminifer epitelin gelişimini tetikleyen Leydig hücrelerinin hipoksiden birincil olarak etkilendiği görülürken antioksidan uygulamasının bu etkileri kısmen geri döndürdüğü dikkati çekmiştir.

Sonuç olarak hipoksinin testiste spermatogenik seride hücre döngüsünü değiştirdiği, proliferasyonu azaltırken apoptozisi arttırdığı; buna karşın Ginkgo biloba'nın koruyucu özellik sergilediği belirlenmiştir. Elektron mikroskopik incelemelerde gözlenen tüm seri hücrelerindeki başta mitokondriyonlar olmak üzere tüm organel düzeyindeki dejenerasyonların ise hipoksinin neden olduğu oksidatif strese bağlı olabileceği, bir antioksidan olan Ginkgo biloba'nın ise stresi ortadan kaldırarak kısmen koruyucu özellik göstermiş olabileceği kanısına varılmıştır. Hipoksinin Leydig hücre aktivitesini arttırdığı saptanmıştır. Bu etkinin neovaskülerizasyona bağlı artan hipofiziyal hormon uyarısı nedeni ile gerçekleşmiş olabileceği kansına varılmıştır. Artan testosteron düzeyinin ise spermatogenezisi hızlandırdığı ancak dejenere spermatosit oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir. Ginkgo biloba uygulamasının koruyucu özellik sergilediği ancak Ginkgo biloba'nın yeterli koruyuculuğunun uzun süre kullanımda sağlanabileceği belirlenmiştir.

7. ÖZET

Gebelikte Olaylanan Deneysel Hipokside Ginkgo Biloba'nın Testis Dokusunda Olası Etkisinin İncelenmesi

Bu çalışmamızda, kronik hipobarik hipoksiye etkin kalan gebe sıçanlardan elde edilen yavrularda, testis gelişimi ve doğum sonrası süreçte uygulanan Ginkgo biloba'nın bu gelişim üzerindeki olası etkilerinin immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu doğrultuda Wistar albino cinsi sıçanlar gebeliğin 5. gününde %10'luk O₂ ve %90'luk N₂ gaz karışımı verilen hipoksik kamaralara konularak 10 gün süreyle bekletilmiştir. Doğum sonrası erkek yavrulardan üç grup oluşturulmuştur. 1. grup kontrol, 2. grup hipoksi, 3. grup hipoksi+Ginkgo biloba. Deneklerden 7., 14., 21. günlerde testis dokuları alınarak hücre çoğalmasını değerlendirmek için PCNA antikoru ile immünohistokimyasal boyama yapılmıştır ve apoptozisin belirlenmesi için TUNEL yöntemi kullanılmıştır. Testis ince yapı düzeyindeki değişiklikler taramalı elektron mikroskopunda değerlendirilmiştir. Her bir grup için altı denekte, altı alanda spermatogenik epitel boyu ölçülmüştür. Shapiro Wilk testi, Bonferroni Düzeltmeli Kruskal Wallis ve Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U testi ile istatistiksel değerlendirme yapılmıştır.

PCNA immün boyamasında hipoksik gruplarda tutulumun kontrol grubuna karşın azaldığı, Ginkgo biloba uygulanan hipoksik gruplarda ise kontrole yakın tutulum olduğu saptanmıştır.

TUNEL yöntemi ile hipoksinin hücre proliferasyonunu azalttığı, buna karşın apoptozisi göreceli indüklediği belirlenmiştir. Ginkgo biloba uygulamasının ise 21. günde kontrole uyumlu koruyuculuk gösterdiği gözlenmiştir.

Elektron mikroskopik incelemelerde, hipoksi grubunda spermatogenik seri ve Leydig hücrelerinde başta mitokondriyal kristolizis ve vakuolizasyon olmak üzere çeşitli dejeneratif değişiklikler gözlenmiştir. Seminifer epitelin gelişimini tetikleyen Leydig hücrelerinin hipoksiden birincil olarak etkilendiği görülürken, Ginkgo biloba uygulanan grupta ise ince yapının kısmen korunduğu saptanmıştır.

Yapılan istatistiksel değerlendirmede de hipoksi grubunda spermatogenik epitel boyunun kontrol grubuna karşın kısaldığı, Ginkgo biloba uygulamasının ise spermatogenik epitel boyunu kısmen arttırdığı belirlenmiştir. 21 günlük hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan grupta ise epitel boyunun kontrole eşdeğer olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak gebelikte uygulanan hipoksinin yavru deneklerin testis yapısında hücre döngüsünü olumsuz yönde etkilediği, Leydig hücre aktivitesini arttırdığı; buna karşın Ginkgo biloba'nın özellikle uzun süreli kullanımda koruyucu etki gösterdiği kanısına varılmıştır.

8. SUMMARY

Evaluation of Ginkgo Biloba's Potential Effects on Testis Tissue in Experimental Hypoxia Induced During Pregnancy

The present study aims to investigate the potential effects of Ginkgo biloba administered during testis development and postnatal periods to the offspring of pregnant rats subjected to chronic hypobaric hypoxia on testis development using immunohistochemical and electron microscopy techniques.

For the study purposes, Wistar albino rats on the fifth day of pregnancy were placed in hypoxic chambers filled with a gaseous mixture of O₂ 10% and N₂ 90% for 10 days. Three groups of postnatal male rats were formed: the first group served as the control, the second as the hypoxia group and the third as the hypoxia + Ginkgo biloba treatment group. Testis tissues were obtained from the experimental animals on Day 7, 14 and 21, which were stained immunohistochemically with PCNA antibody to study cell proliferation and evaluated using the TUNEL method to determine apoptosis. Changes on the testis thin structure level were examined by using scanning electron microscope. Length of the spermatogenic epithelium was measured in six animals at six points for each group. Statistical analyses were carried out using Shapiro Wilk test, Bonferroni Adjusted Kruskal Wallis and Bonferroni Adjusted Mann Whitney U tests.

PCNA immunostaining demonstrated decreased involvement in the hypoxic group compared to the control group, while the extent of involvement was similar between the hypoxic group to which Ginkgo biloba was administered, and the control group.

TUNEL assay showed decreased cell proliferation with hypoxia, whereas apoptosis was relatively induced by this condition. Administration of Ginkgo biloba demonstrated protective effects consistent with the control group on Day 21.

Electron microscopic studies revealed spermatogenic serial changes and several degenerative alternations, particularly mitochondrial cristae lysis and vacuolization in Leydig cells in the hypoxia group. Leydig cells, which stimulate the development of seminiferous epithelium, were primarily affected by hypoxia, while the thin structure was partially protected in the group to which Ginkgo biloba was administered.

Statistical analyses also showed shorter spermatogenic epithelium length in the hypoxic group compared to the control group, whereas a partial increase was achieved after treatment with Ginkgo biloba. In the hypoxic group treated with Ginkgo biloba for 21 days, epithelium length was comparable to that observed in the control group.

In conclusion, hypoxia induced during pregnancy adversely affects cell cycle in testis structure of the offspring of experimental animals and also induced Leydig cells activity. On the other hand Ginkgo biloba provides protective effects, particularly with long-term use.

9. KAYNAKLAR

1. Öztürk L, Metin G, Pelin Z, ve ark. Aralıklı hipoksi ve fizyolojik uyum. Solunum 2003; 5(3): 121-126.
2. Odyakmaz B. Deneysel Hipokside Ginkgo Glikozitlerinin Sitoprotektif Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı; 1994.
3. Kurtuluş H, Eskiocak S, Tütüncüler F, Başaran ÜN, Gülen Ş, ve ark. Deneysel sistemik hipoksi geliştirilmiş yenidoğan ratlarda N-asetilsistein uygulamasının etkileri. Turk J Biochem 2003; 28(2): 40-44.
4. Şinoforoğlu T. Yüksek İrtifanın Beden Eğitimi ve Spor Yüksekokulu Bayan Öğrencilerin Fiziksel ve Fizyolojik Parametreleri Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beden Eğitimi ve Spor Anabilim Dalı; 2002.
5. Günay M, Cicioğlu İ. Spor Fizyolojisi. 1. baskı. Ankara: Gazi Kitabevi; 2001.
6. Atış S. Yüksek irtifalarda ortaya çıkan acil akciğer sorunları. Solunum 2004; 6(1): 40-43.
7. Rodway G, Hoffman L, Sanders M, et al. High-altitude-related disorders—part I: pathophysiology, differential diagnosis, and treatment. Heart & Lung 2003; 32(6): 353-359.
8. Metin G. Yüksek rakımlarda egzersiz. Solunum 2004; 6(2): 89-97.
9. Bustos-Obregon E, Esveile C, Contreras J, Maurer I, Sarabia L, et al. Effects of chronic stimulated hypobaric hypoxia on mouse spermatogenesis. Int J Morphol 2006; 24(3): 481-488.
10. Ağgön E. Orta Dereceli Yüksek Rakımda Yapılan Yedi Günlük Kamp Sürecinin Amatör Dağcılarda Oksidatif Stres ve Dinamik Akciğer Fonksiyonları Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Erzurum: Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beden Eğitimi ve Spor Anabilim Dalı; 2006.

- 11.** Ganong WF. Tıbbi Fizyoloji. Türk Fizyoloji Bilimler Derneği (Çev). 20.Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002.
- 12.** Gallagher SA, Hackett PH. High-altitude illness. *Emerg Med Clin N Am* 2004; 22: 329-355.
- 13.** Alippi RM, Barcelo AC, Rio ME, Bozzini CE, et al. Growth retardation in the early developing rat exposed to continuous hypobaric hypoxia. *Acta Physiol Lat Am* 1983; 33(1): 1-5.
- 14.** Bakonyi T, Radak Z. High altitude and free radicals. *JSSM* 2004; 3: 64-69.
- 15.** Liu L, Wise DR, Diehl JA, Simon MC, et al. Hypoxic reactive oxygen species regulate the integrated stress response and cell survival. *JBC* 208; 283(45): 31153-31162.
- 16.** Özkan KE, İnanc F, Kılınç M, Boran Ç, ve ark. Leptin tedavisi yeni doğan rat incebarsağında hipoksi/reoksijenasyon hasarına karşı koruyucu mudur?. *Fırat Tıp Dergisi* 2005;10(1): 5-9.
- 17.** Moore LG, Shriver M, Bemis L, Hickler B, Wilson M, Brutsaert T, Parra E, Vargas E, et al. Maternal adaptation to high-altitude pregnancy an experiment of nature—a review. *Placenta* 2004; 25 Suppl A: 60-71.
- 18.** Liu JX, Du JZ. Hypoxia alters neonatal rats. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; 23(3): 231-237.
- 19.** Verratti V, Berardinelli F, Di Giulio C, Bosco G, Cacchio M, Pellicciotta M, Nicolai M, Martinotti S, Tenaglia R, et al. Evidence that chronic hypoxia causes reversible impairment on male fertility. *Asian J Androl* 2008; 10(4): 602-606.
- 20.** Farias JG, Bustos-Obregon E, Orellana R, Bucarey JL, Quiroz E, Reyes JG, et al. Effects of chronic hypobaric hypoxia on testis histology and round spermatid oxidative metabolism. *Andrologia* 2005; 37: 47-52.
- 21.** Gosney JR. Effects of hypobaric hypoxia on the Leydig cell population of the testis of the rat. *J Endocrinol* 1984; 103: 59-62.
- 22.** Askew EW. Work at high altitude and oxidative stress: antioxidant nutrients. *Toxicology* 2002;180: 107-119.

- 23.** Ikeda K, Negishi H, Yamori Y, et al. Antioxidant nutrients and hypoxia/ischemia brain injury in rodents. *Toxicology* 2003;189: 55-61.
- 24.** Rouse J. *Ginkgo biloba*: mind, mood, and memory. *Journal of Applied Nutritional Science* 1998; 6(7): 1-2.
- 25.** Al-Yahya AA, Al-Majed AA, Al-Bekairi AM, Al-Shabanah OA, Qureshi S, et al. Studies on the reproductive, cytological and biochemical toxicity of *Ginkgo biloba* in Swiss albino mice. *J Ethnopharmacol* 2006; 107: 222-228.
- 26.** Lippi G, Targher G, Guidi CG, et al. *Ginkgo biloba*, inflammation and lipoprotein (a). *Atherosclerosis* 2007; 195: 417-418.
- 27.** Singh B, Kaur P, Gopichand, Singh RD, Ahuja PS, et al. Biology and chemistry of *Ginkgo biloba*. *Fitoterapia* 2008; 79: 401-418.
- 28.** Sadler TW. *Langman Medikal Embriyoloji*. Başaklar AC (Çev), 9.Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2005.
- 29.** Moore KL, Persaud TVN. *Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi*. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H (Çeviri Editörleri), 6. İngilizce Baskıdan Çeviri. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002.
- 30.** Usta A. *Leptinin Yenidoğan Sıçanların Testis Germ Hücrelerine Etkisinin Işık Mikroskopi Düzeyinde İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Denizli: Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı 2005.
- 31.** Coşgun A, Aras D, editörler. *Anatomi Histoloji Embriyoloji*. Nobel Tıp Kitabevleri; 1998.
- 32.** Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş*. Demir R (Çeviri editörü). Ankara: Palme Yayıncılık; 2006.
- 33.** Strauss JF, Barbieri RL. *Yen ve Jaffe Üreme Endokrinolojisi*. Günalp S (Çeviri Editörü), 5. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2006.
- 34.** Ross MH, Pawlina W. *Histology- A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*. 5. Baskı. Philadelphia: Lippincott W&W; 2006.
- 35.** Ozan H. *Ozan Anatomi*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2006.

- 36.** Moore KL, Dalley AF. Kliniğe Yönelik Anatomi. Şahinoğlu K (Çeviri Editörü), 4. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2007.
- 37.** Yücel HA. Erkek Genital Sistemi. İçinde: Gökmen Gövsa F, editör. Sistematik Anatomi. İzmir: İzmir Güven Kitabevi; 2003. S: 549-551.
- 38.** Hatipoğlu MT, Hatipoğlu HG. Yüksekokullar Anatomi Ders Kitabı. 1. Baskı. Ankara: Selvi Yayınevi; 2006.
- 39.** Arıncı K, Elhan A. Anatomi 1. Cilt. 3. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2001.
- 40.** Moore KL, Agur AML. Temel Klinik Anatomi. Elhan A (Çeviri Editörü), 2. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2006.
- 41.** Yıldırım M. İnsan Anatomisi Cilt 2. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2006.
- 42.** Cumhur M, editör. Temel Anatomi. 1. Baskı. Ankara: ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş.-METU Press; 2001.
- 43.** Aktümsek A. Anatomi ve Fizyoloji İnsan Biyolojisi. 3. Baskı. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım; 2006.
- 44.** J Bullock, Boyle J, Wang MB. Fizyoloji. Hariri N (Çeviri Editörü), 2. Baskı. İzmir: Saray Tıp Kitabevleri; 1994.
- 45.** Snell RS. Klinik Anatomi. Yıldırım M (Çeviri Editörü), 6. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2004.
- 46.** Sancak B, Cumhur M, editörler. Fonksiyonel Anatomi Baş-Boyun ve İç Organlar. 2. Baskı. Ankara: ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş.-METU Press; 2002.
- 47.** Ekinci S, Hatipoğlu GH. Tıbbi Terminoloji. 1. Baskı. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi; 2005.
- 48.** Hatiboğlu MT, Turgut HB. Anatomi ve Histoloji Terimleri Söyleyiş ve Yazım Kılavuzu. 1. Baskı. Ankara: SBAD Yayınları; 1996.
- 49.** Hatiboğlu MT. Anatomi Sözlüğü. 6. Baskı. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi; 2005.

- 50.** Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. 3. Baskı. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2007.
- 51.** Henrikson RC, Kaye GI, Mazurkiewicz JE. NMS Histology. 1. Baskı. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1997.
- 52.** Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM. Gray's Anatomi Tıp Fakültesi Öğrencileri İçin. Yıldırım M (Çeviri Editörü). Ankara: Güneş Kitabevi; 2007.
- 53.** Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S (Çeviri Editörleri). 10. Baskıdan Çeviri. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2006.
- 54.** Erdoğan D, Hatipoğlu MT, Görgün M, Ilgaz C. Genel Histoloji. 3. Baskı. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi; 2008.
- 55.** Young B, Heath JW. Wheater's functional histology. 4. Baskı. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2000.
- 56.** Ovalle WK, Nahirney PC. Netter's essential histology. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çeviri Editörleri). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2009.
- 57.** Erkoçak A. Özel Histoloji. 4. Baskı. Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Basımevi; 1982.
- 58.** Akkoç Özgüden CG. Postnatal Gelişme Dönemlerinde Capsaicin Uygulanan Fare Testislerinde Transforming Growth Factor β 'nin İmmunohistokimyasal Ekspresyonu. Doktora Tezi. Bursa: Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı; 2007.
- 59.** Larsen WJ. Human Embryology. 2. Baskı. New York: Churchill Livingstone; 1997.
- 60.** O'Rahilly R, Müller F. Human Embryology & Teratology. 3. Baskı. New York: Wiley-Liss; 2001.
- 61.** Bloom DW, Fawcett RP. Bloom & Fawcett's Histology. 2. Baskı. London: Arnold; 2002.
- 62.** Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. Fizyoloji. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği (Çev), 5. Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2008.

- 63.** Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Çavuşoğlu H, Çağlayan Yeğen B (Çeviri Editörleri), 11. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2007.
- 64.** Akdeniz E. Testiste Spermatogenik Hücrelerde $\beta 1$ İntegrinler ve Fibronektin Dağılımı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı; 2004.
- 65.** Bozdoğan Ö. Fizyoloji. 2. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2004.
- 66.** Yaman K. Fizyoloji. 3. Baskı. Bursa: VİPAŞ; 1999.
- 67.** Gubari S. Karbosulfanla Kontamine Besin Alımının Sıçan Testisi Üzerine Kronik Etkilerinin İnce Yapı Düzeyinde Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Adana: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı; 2008.
- 68.** Cumbul A. Deneysel Vazektominin Farklı Süreler Sonrasında Erişkin Sıçan Testisinde Oluşturduğu Morfolojik Değişikliklerin Stereolojik Yöntemlerle İncelenmesi. Doktora Tezi. Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı; 2008.
- 69.** Klug WS, Cummings MR. Genetik Kavramlar. Öner C (Çeviri Editörü), 2.Türkçe Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2003.
- 70.** Karol S, Ayvalı C, Suludere Z. Hücre Biyolojisi. 4. Baskı. Ankara: Öğün Matbaacılık; 2000.
- 71.** Noyan A. Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. 15. Baskı. Ankara: Meteksan; 2005.
- 72.** Costanzo LS. Board Rewiev Serisi Fizyoloji. Özgünen KT, Özgünen T (Çeviri Editörleri), 3. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2003.
- 73.** Brahimi-Horn MC, Pouysségur J. Oxygen, a source of life and stres. FEBS Letters 2007; 581: 3582-3591.
- 74.** Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL, editors. The Testis Volume III Influencing Factors. New York: Academic Pres; 1970.
- 75.** Basım S. Alt Ekstremitede İskemi-Reperfüzyon Oluşturulan Ratlarda Ginkgo biloba EGB 761'in Barsak Anastomoz İyileşmesi Üzerine Etkisi.

Uzmanlık Tezi. İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Cerrahi Kliniği; 2005.

76. Halliwell B, Chirio S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57(5 Suppl): 715-724.

77. Çavuş BT, Emre B. Platelet aktive edici faktör (PAF) antagonisti EGb 761 ekstresinin fare trombosit sayısı ve büyüklüğü üzerine in vivo etkisi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi* 2005; 76 (3-4): 42-48.

78. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T ve ark. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997; 3-4: 92-95.

79. Logani S, Meng Cheng Chen, Tran T, Le T, Robert B. Rafa, et al. Actions of Ginkgo Biloba related to potential utility for the treatment of conditions involving cerebral hypoxia. *Life Sciences* 2000; 67: 1389-1396.

80. McKenna DJ, Jones K, Hughes K, Humphrey S. *Botanical Medicines: The Desktop Reference for Major Herbal Supplements*. 2. Baskı. New York: The Haworth Herbal Press; 2002.

81. Karagöz Tong E. Fötal Alkol Sendromunda Vitamin A, Vitamin E ve Ginkgo Bilobanın Karaciğer İnce Yapısı Üzerine Etkileri. Doktora Tezi. Ankara: Gazi Üniversite, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı; 2003.

82. Al-Yahya AA, Al-Majed AA, Al-Bekairi AM, Al-Shabanah, Qureshi S., et al. Studies of reproductive, cytological and biochemical toxicity of Ginkgo Biloba in Swiss albino mice. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 107: 222-228.

83. Ebadi M. *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine*. Boca Raton: CRC Pres; 2002.

84. Walton A, Uruski W. The effects of low atmospheric pressure on the fertility of male rabbits. *Journal of Experimental Biology* 1946; 23: 71-76.

85. Nakanishi K, Tajima F, Nakamura A, Yagura S, Ookawara T, Yamashita H, Suziki K, Taniguchi N, Ohno H, et al. Antioxidant system in hypobaric-hypoxia. *Journal of Physiology* 1995; 489: 869-876.

- 86.** Okumura A, , Fuse H, Kawauchi Y, Mizuno I, Akashi T, et al. Changes in male reproductive function after high altitude mountaining. *High Altitude Medicine & Biology* 2003; 4(3): 349-353.
- 87.** Gasco JM, Rubio A, Chung LV, Gonzales GF, et al. Effect of high altitude exposure on spermatogenesis and epididymal sperm count in male rats. *Andrologia* 2003; 35: 368-374.
- 88.** Farías JG, Bustos-Obregon E, Reyes JG, et al. Increase in testicular temperature and vascularization induced by hypobaric hypoxia in rats. *J Androl* 2005; 26(6): 693-697.
- 89.** Fahim MS, Mesihha FS, Girgis SM, et al. Effect of acute and chronic simulated high altitude on male reproduction and testosterone level. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 1980; 4(3): 217-219.
- 90.** Nelson ML, Cons JM. Pituitary hormones and growth retardation in rats raised at simulated high altitude (3,800 meters). *Environ Physiol Biochem* 1975; 5: 273-282.
- 91.** Gosney JR. Morphological changes in the pituitary and thyroid of the rat in hypobaric hypoxia. *J Endocrinol* 1986; 109: 119-124.
- 92.** Altunkaynak BZ, Özbek E. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2008; 6(2): 93-104.
- 93.** Bittar EE, Bittar N, editors. *Principles of Medical Biology: Volume 13 Cell Injury*. England: JAI Press Inc; 1998.
- 94.** Şimşek F. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipit peroksidasyonu. *T Klin J Pediatr* 1999, 8: 42-47.
- 95.** Sierpina VS, Wollschlaeger B, Blumenthal M, et al. Ginkgo biloba. *Am Fam Physician* 2003; 68: 923-926.
- 96.** Liao WG, Gao YQ, Cai MC, Wu Y, Huang J, Fan YM, et al. Hypoxia promotes apoptosis of germ cells in rat testes. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2007; 13(6): 487-491.
- 97.** Chua JS, Huang CS, Chang KJ, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolabeling as a prognostic factor in invasive ductal carcinoma of the breast in Taiwan. *Cancer Letters* 1998; 131: 145-152.

- 98.** Angelopoulou R, Balla M, Lavranos G, Chalikias M, Kitsos C, Baka S, Kittas C, et al. Evaluation of immunohistochemical markers of germ cells' proliferation in the developing rat testis: A comparative study. *Tissue and Cell* 2008; 40: 43-50.
- 99.** Angelopoulou R, Balla M, Lavranos G, Chalikias M, Kitsos C, Baka S, Kittas C, et al. Sertoli cell proliferation in the fetal and neonatal rat testis: A continuous phenomenon?. *Acta Histochemica* 2008; 110: 341-347.
- 100.** Bae SI, Zhao R, Snapka RM, et al. PCNA damage caused by antineoplastic drugs. *Biochemical Pharmacology* 2008; 76: 1653-1668.
- 101.** Zhang L, Han XK, Qi YY, Liu Y, Chen QS, et al. Seasonal effects on apoptosis and proliferation of germ cells in the testes of the Chinese soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*. *Theriogenology* 2008; 69: 1148-1158.
- 102.** Phil-Ok KOH, Myeong-Ok KIM. Ethanol exposure decreases cell proliferation and increases apoptosis in rat testes. *J Vet Med Sci* 2006; 68 (10): 1013-1017.
- 103.** Chen Y, Zuo Z, Chen S, Yan F, Chen Y, Yang Z and Wang Z, et al. Reduction of spermatogenesis in mice after tributyltin administration. *Toxicology* 2008; 251: 21-27.
- 104.** Waseem NH, Lane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 1990; 96: 121-129.
- 105.** Steger K, Aleithe I, Behre H and Bergmann M, et al. The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Mol. Hum. Reprod.* 1998; 4(3): 227-233.
- 106.** Jarvis S, Elliott DJ, Morgan D, Winston R, Readhead C, et al. Molecular markers for the assessment of postnatal development in the mouse. *Hum. Reprod.* 2004; 20(1): 108-116.
- 107.** Bernal-Manas CM, Morales E, Pastor LM, Pinart E, Bonet S, de la Rosa P, Briz MD, Zuasti A, Ferrer C, Canteras M. Proliferation and apoptosis of spermatogonia in postpuberal boar (*Sus domesticus*) testes

with spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchidism. *Acta Histochemica* 2005; 107: 365-372.

108. Sarada SKS, Dipti P, Anju B, Pauline T, Kain AK, Sairam M, Sharma SK, Ilavazhagan G, Kumar D, Selvamurthy W, et al. Antioxidant effect of beta-carotene on hypoxia induced oxidative stress in male albino rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 79: 149-153.

109. Ilavazhagan G, Bansal A, Prasad D, Thomas P, Sharma SK, Kain AK, Kumar D, Selvamurthy W, et al. Effect of vitamin E supplementation on hypoxia-induced oxidative damage in male albino rats. *Aviation Space Environ Medicine* 2001; 72: 899-903.

110. Baron-Ruppert G, Luepke N.P. Evidence for toxic effects of alkylphenols from *Ginkgo biloba* in the hen's egg test (HET). *Phytomedicine* 2001; 8: 133-138.

111. Boniel T, Dannon P. The safety of herbal medicines in the psychiatric practice. *Harefuah* 2001;140: 780-783.

112. McKenna DJ, Jones K, Hughes K, et al. Efficacy, safety, and use of *Ginkgo biloba* in clinical and preclinical applications. *Alternative Therapies in Health and Medicine* 2001;7: 70-86, 88-90.

113. Hecker H, Johannison R, Koch E, Siegersa CP, et al. In vitro evaluation of the cytotoxic potential of alkylphenols from *Ginkgo biloba* L. *Toxicology* 2002;177: 167-177.

114. Mazzanti G, Mascellino NMT, Battinelli L, Coluccia D, Manganaro M, Saso L, et al. Antimicrobial investigation of semipurified fractions of *Ginkgo biloba* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 71: 83–88.

115. Hibatallah J, Carduner C, Poelman MC, et al. In-vivo and in-vitro assessment of the free-radical-scavenger activity of *Ginkgo* flavone glycosides at high concentration. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51: 1435-1440.

116. Nishida S ve Satoh H. Comparative vasodilating actions among terpenoids and flavonoids contained in *Ginkgo biloba* extract. *Clin Chim Acta* 2004; 339: 129-133.

- 117.** Yao P, Li K, Jin Y, Song F, Zhou S, Sun X, Nüssler AK, Liu L, et al. Oxidative damage after chronic ethanol intake in rat tissues: Prophylaxis of Ginkgo biloba extract. *Food Chemistry* 2006; 99(2): 305-314.
- 118.** Sastre J, Millaan A, Garcia de la Asuncion J, Pla R, Juan G, Pallardó, O'Connor E, Martin JA, Droy-Lefaix MT, Vina J, et al. A Ginkgo Biloba Extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 1998; 24(2): 298-304.
- 119.** Gertsch JH, Seto TB, Mor J, Onopa J, et al. Ginkgo biloba for the prevention of severe Acute Mountain Sickness (AMS) starting one day before rapid ascent. *High Altitude Medicine & Biology* 2002; 3(1): 29-37.
- 120.** Guinot P, Caffrey E, Lambe R, Darragh A, et al. Tanakan inhibits Platelet-Activating-Factor-induced platelet aggregation in healthy male volunteers. *Haemostasis* 1989;19: 219-223.
- 121.** Koch E. Inhibition of platelet activating factor (PAF)-induced aggregation of human thrombocytes by ginkgolides: considerations on possible bleeding complications after oral intake of Ginkgo biloba extracts. *Phytomedicine* 2005; 12: 10-16.
- 122.** Pinto RM, Fernandes ES, Reis JE, Peters VM, Guerra Mde O, et al. Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of Ginkgo biloba to rats. *Reproductive Toxicology* 2007; 23: 480-485.
- 123.** Orhan İ, Hayıt H, Duksal İ, Özercan İH, Fırdolaş F, Semerciöz A, ve ark. Tek taraflı testis torsiyonunda PAF antagonistinin karşı taraf testisin iskemik hasarındaki koruyucu etkinliği. *Türk Üroloji Dergisi* 2004; 30(1): 11-16.
- 124.** Akgül T, Ayyıldız A, Nuhoğlu B, Karagüzel E, Ögüş E, Yağmurdur H, Üstün H, Germiyanoglu C. Ginkgo biloba (EGb 761) usage attenuates testicular injury induced by testicular ischemia/reperfusion in rats. *Int Urol Nephrol* 2008; 40(3): 685-690.

10. EKLER

EK 1 ETİK KURUL RAPORU



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

13.02/2008

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/18-2549-
KONU:

Sayın

Yrd.Doç.Dr.Gülnur TAKE
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-08.006 kod numaralı ve "Gebelikte Olaylanan Deneysel Hipokside Ginkgo Bilobanın Testis Dokusunda Olası Tedavi Edici Etkisi: Transmission ve Scanning Elektron Mikroskopik Çalışma" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-08.006 and entitled "The Probable Therapeutic Effects Of Ginkgo Biloba After The Experimental Hypoxia in Pregnancy On Postnatal Testes Development: Transmission and Scanning Electron Microscopic Study" is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards.

Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı
Chairman
Gazi University Experimental Animals Ethical Council

Prof.Dr.Engin ÇALGÜNER

Prof.Dr.Nedret KILIÇ

Prof.Dr.Sevil PEHLİVAN

Prof.Dr.Deniz ERDOĞAN

Prof.Dr.Deniz ERBAŞ

Prof.Dr.Fatma AKAR

Prof.Dr.Altan DOĞAN

Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU

Uzman Dr.Şeyda DİKER

	T.C. GAZİ ÜNİVERSİTESİ KATILIM SERTİFİKASI
Sayın <u>Yük. Lec. Çr. Elç. ENÇARİ</u>	
Gazi Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu onayı ile Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından, 21-29 Aralık 2009 tarihleri arasında düzenlenen "Deneysel Hayvanların Uygulama ve Etik Kursu 1/11" ye katılarak Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.	
Prof. Dr. Nürten TÜRKÖZKAN Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi Müdürü	Prof. Dr. Gökhan ALPAŞLAN Deneysel Hayvanları Etik Kurulu Başkanı
Prof. Dr. Rıza AYHAN Rektör	

11. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, değerli vaktini ve bilimsel desteğini sunan, zengin bakış açısıyla beni aydınlatan, bilim insanı olmasının yanında insani ilişkilerde de yetişme ve gelişmeye katkıda bulunan çok kıymetli hocam Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Deniz ERDOĞAN başta olmak üzere; eğitimim ve tez çalışmalarımın başlangıcından sonuna kadar her aşamasında, bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek, karşılaştığım problemlerin çözümünde deneyimlerinden yararlandığım, her konuda destek olan ve yol gösteren, benim için ayrı bir yeri olan değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Gülnur TAKE'ye; beni bilgi ve tecrübeleri ile aydınlatan ve öğretmenlik yapan hocalarım Prof. Dr. Tahir HATİPOĞLU'na, Prof. Dr. Celal ILGAZ'a, Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL'a ve Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU'na; eğitimim ve tez çalışmalarım süresince ilgisini, desteğini, bilgi ve önerilerini benden esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Çiğdem ELMAS'a; deneylerimin bütün aşamalarında büyük yardım ve ilgisini gördüğüm çok sevdiğim ablalarım Arş. Gör. Fatma HELVACIOĞLU'na; Arş. Gör. Güleser GÖKTAŞ'a ve Arş. Gör. Seren Gülşen GÜRGEN'e; her zaman güler yüzü ve yardımları ile yanımda hissettiğim Anabilim Dalı personelimiz Şemsi OZTURK'e; Anabilim Dalı personellerimiz Recep ORHAN ve Tekin KOÇAK'a; birlikte eğitim gördüğüm çok sevgili dönem arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Canım ailem, her konuda beni desteklediğiniz, sonsuz sevgi ve ilginizi esirgemediğiniz için, gösterdiğiniz özveri, anlayış ve güvenden dolayı sonsuz teşekkürler, iyi ki varsınız.

Elif ENSARİ

Ocak 2010-ANKARA

12. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Ankara'da doğdum. İlkokul eğitimimi Ulubatlı Hasan İlkokulu'nda; orta okulu Bahçelievler Deneme Lisesi'nde, lise eğitimimi ise Ankara Gazi Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2003 yılında Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne girdim. 2007 yılında bölüm ikincisi olarak mezun oldum. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım.

Elif Ensari
Ocak 2010-ANKARA